



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCIENCIAS MOLECULARES

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DEL PERFIL INMUNITARIO POSTRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS, EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE EN REMISIÓN COMPLETA DE LARGA DURACIÓN**

ANA ROSA ARTECHE LÓPEZ  
MADRID, 2017



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DEL PERFIL INMUNITARIO POSTRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS, EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE EN REMISIÓN COMPLETA DE LARGA DURACIÓN**

**Ana Rosa Arteche López**

Bioquímica

Trabajo dirigido por:

**Cecilia Muñoz Calleja y Adrián Alegre Amor**

En el Hospital Universitario de La Princesa  
Madrid, 2017

D<sup>a</sup> Cecilia Muñoz Calleja, profesora asociada de Inmunología del Dpto. de Medicina de la UAM y FEA de Inmunología del Hospital Universitario de La Princesa y D. Adrián Alegre Amor, profesor asociado de Hematología y Jefe de Servicio de Hematología del Hospital Universitario de La Princesa,

CERTIFICAN:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por D<sup>a</sup> Ana Rosa Arteché López, titulado “Evaluación del perfil inmunitario postrasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos, en pacientes con mieloma múltiple en remisión completa de larga duración”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, firman la presente certificación a 02 de Noviembre de 2017

Fdo. Dra. Cecilia Muñoz Calleja  
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo. Dr. Adrián Alegre Amor  
Co-director de la Tesis Doctoral

*A mi familia,  
A mi madre y a mi padre,*

***“Nada ni nadie conseguirá que deje de ser Atlético”***



*Fdo. Juan Carlos Arteche*

## ***AGRADECIMIENTOS***

A la Dra. Cecilia Muñoz Calleja por aceptarme, guiarme y facilitarme el camino para la realización de esta tesis doctoral. Gracias por todos sus consejos, por enseñarme tanto por tan poco. Es un ejemplo a seguir tanto en lo personal como en lo profesional.

Gracias a todo el departamento de Inmunología por su acogida y ayuda durante estos años, en especial al Dr. Sánchez Madrid por aceptarme en el servicio y a los residentes de Inmunología y a Víctor y a Ana por enseñarme y ayudarme con el “mundo” de la citometría de flujo.

Al Dr. Adrián Alegre Amor por su co-dirección de tesis y al servicio de Hematología por su ayuda y por su cuidado y dedicación con los pacientes. Gracias también al servicio de Análisis Clínicos, a Pilar y en especial a Natalia, por ser mi aliada y ayudarme en los momentos más complicados.

Gracias a la Dra. Mercedes Espiño y a la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Villar del servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal, por su trabajo y colaboración en esta tesis.

A mis amigos/as por apoyarme en todo momento y comprender “mis ausencias”.

Gracias a Víctor, mi compañero de viaje, gracias por su paciencia, comprensión y ánimos. Ha sido un apoyo fundamental durante esta tesis y es muy importante en mi vida.

Gracias a mis hermanas y a mis “cuasi-padres” Mari y Manolo por formar parte de mi vida pero sobre todo, gracias a mi madre por su valentía y entrega hacia nosotras. Porque es quien mejor me entiende y quien está siempre en el momento y lugar adecuado. Ha sido mi pilar básico durante esta tesis y sin su ayuda no hubiera sido posible.

Y cómo no, gracias a mi padre, porque aunque ausente está siempre con nosotras. Por enseñarnos a no rendirnos nunca e inculcarnos sus valores. Sé que hoy estaría muy orgullo de nosotras, y no sólo por esta tesis, sino por vernos cumplir aquel “*Sed buenas personas*”. Te queremos

***RESUMEN/ABSTRACT***

El mieloma múltiple (MM) es la segunda neoplasia hematológica más frecuente. La introducción del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE) y de los nuevos agentes terapéuticos (IMiDs, IP, etc) en el tratamiento del MM ha aumentado significativamente el porcentaje de pacientes que logran una respuesta completa de larga duración (LTCR), mejorando la supervivencia global. Sin embargo, desconocemos si los pacientes en LTCR posTASPE han alcanzado una reconstitución inmunitaria característica que favorezca el estado de remisión completa (RC) evitando recaídas. Asimismo, las respuestas al tratamiento en MM son muy heterogéneas y un 50% de las recaídas ocurren sin que se hayan detectado datos biológicos de la enfermedad, por lo que es fundamental disponer de biomarcadores precoces de recaída que permitan individualizar la terapia y mejorar la supervivencia en MM. Por ello, en este trabajo se plantearon dos objetivos: 1) Evaluar, mediante el estudio del inmunofenotipo, por citometría de flujo de las distintas subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica y de la inmunoparesia, si los pacientes MM-LTCR presentan un perfil inmunitario característico, específico y estable asociado a la calidad de la respuesta terapéutica posTASPE; 2) Analizar el valor del ensayo de HLC y, en concreto, el ratio cadena involucrada/no involucrada (rI/U), en la predicción precoz de recaídas en pacientes en RC posTASPE.

Los pacientes MM-LTCR presentaron un perfil inmunitario caracterizado por un incremento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria efectores; células NK diferenciadas que permiten una inmunovigilancia competente y un aumento de linfocitos B *naïve* que garantizan la homeostasis de la respuesta humoral, la recuperación de las células plasmáticas normales y la ausencia de inmunoparesia. Este patrón inmunitario aparece en los primeros años posTASPE, se mantiene estable a lo largo del tiempo y no parece tratarse de un patrón específico de la enfermedad de base ya que es muy similar al encontrado en pacientes con linfoma en LTCR posTASPE. Por otra parte, en los pacientes con MM en RC posTASPE que recaerán se observa una elevación precoz del rI/U mientras que los valores que clásicamente se emplean en el seguimiento de los pacientes con MM, como son las inmunoglobulinas totales, el cociente cadenas ligeras libres o la inmunofijación de suero, no anticipan dicha recaída. Esto sugiere la utilidad del ensayo HLC, y más concretamente del rI/U, en la identificación de pacientes trasplantados en RC con mayor riesgo de progresión. No obstante, para confirmar la utilidad de este parámetro como biomarcador precoz de recaídas serían necesarios estudios adicionales de validación.

En conclusión, nuestro estudio supone un primer paso en la evaluación del papel de los estudios inmunológicos en la identificación de distintos grupos de pacientes en relación a la respuesta terapéutica al TASPE. Asimismo, y aunque son necesarios más estudios de validación, nuestro estudio apoya la capacidad del ensayo HLC, no sólo como marcador precoz de recaídas, sino también como marcador de la reconstitución inmunitaria en pacientes en RC trasplantados.



Multiple myeloma (MM) is the second most frequent hematological malignancy. With the introduction of high-dose therapy followed by autologous stem cell transplantation (HDT/ASCT) and the novel agents (IMiDs, IP, etc), the percentage of patients achieving a long-term complete response (LTCR) has significantly increased, thus improving overall survival in MM. However, it is unknown if the LTCR-MM patients have a specific condition of the lymphoid subpopulations after ASCT, that could maintain their complete remission (CR status and avoid relapse. Besides, MM responses are very heterogeneous and 50% of relapses occur without biological signs of disease, making it essential to have early relapse biomarkers that could allow patient targeted therapy with improved survival.

Therefore, there are two main goals in this study: 1) To evaluate if the MM-LTCR patients have a characteristic, specific and stable immune profile associated with the quality of the therapeutic response to ASCT, by analyzing the different lymphoid subpopulations in the peripheral blood by flow cytometry and the immunoparesia; 2) To analyze the utility of the heavy-light chains test (HLC) and, in particular, the involved chain/uninvolved chain ratio(rI/U) to predict early relapse in patients in CR after ASCT.

MM-LTCR patients showed an immune profile characterized by an increase of the effector memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes and differentiated NK cells suggesting an efficient mechanism to control the tumour. An increment of *naïve* B-cells was also detected supporting supports the hypothesis that this event guarantees the homeostasis of the humoral response, the recovery of normal plasma cells and the absence of immunoparesis. It seems that this immune profile remains stable over time, appears during the early years after transplantation and it is not a specific pattern of MM since the immune profile is very similar to that found in LTCR patients with lymphoma after ASCT.

In MM patients in CR after ASCT who will relapse, the rI/U started to increase earlier than the other parameters analyzed, suggesting its utility as an early biomarker of relapse in patients in CR. Further studies are needed to confirm this finding.

In conclusion, this is a first step in defining the role of immunological studies in the identification of patients with different outcomes after ASCT. Furthermore, even though validation studies are needed, this study also supports the utility of the heavy-light chains test, not only as an early relapse biomarker, but also as a marker of immune recovery in transplanted patients in CR.

## ***ÍNDICE***

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1.Mieloma múltiple: Definición.....</b>	<b>7</b>
<b>2.Respuesta inmunitaria .....</b>	<b>7</b>
2.1 Inmunidad adaptativa humoral.....	8
2.2 Estructura de una inmunoglobulina.....	8
2.3 Inmunidad adaptativa celular .....	9
2.3.1 Linfocitos T .....	9
2.3.2 Linfocitos B.....	11
2.3.3 Células Natural Killer.....	12
<b>3.Patogenia del mieloma múltiple .....</b>	<b>13</b>
3.1 Célula plasmática .....	13
3.2 Eventos oncogénicos.....	13
3.3 Microambiente medular .....	14
3.4 Inmunidad anti-tumoral.....	14
<b>4.Clínica y diagnóstico del mieloma múltiple .....</b>	<b>16</b>
<b>5.Factores de riesgo y estadiaje del mieloma múltiple .....</b>	<b>17</b>
5.1 Factores relacionados con las características de los pacientes .....	17
5.2 Factores relacionados con la biología de la enfermedad.....	17
5.3 Factores relacionados con las alteraciones genéticas .....	17
5.4 Factores relacionados con la masa tumoral: Sistema de estadiaje .....	17
5.5 Factores relacionados con la respuesta al tratamiento.....	18
<b>6.Tratamiento del mieloma múltiple .....</b>	<b>18</b>
6.1. Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos: Fases .....	19
6.2. Nuevas estrategias terapéuticas: Inmunoterapia.....	20
<b>7.Enfermedad mínima residual.....</b>	<b>21</b>
<b>8.Respuesta al tratamiento en mieloma múltiple .....</b>	<b>22</b>
<b>9.Reconstitución inmunitaria postTASPE .....</b>	<b>24</b>
9.1 Reconstitución de linfocitos B .....	24

9.2 Reconstitución de linfocitos T.....	24
9.3 Reconstitución de células NK .....	25
<b>10. Nuevos biomarcadores en mieloma múltiple .....</b>	<b>25</b>
10.1 Biomarcadores del sistema inmunitario .....	25
10.2 Biomarcadores moleculares .....	26
10.3 Biomarcadores de imagen .....	26
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>1.Hipótesis de trabajo .....</b>	<b>29</b>
<b>2.Objetivos .....</b>	<b>29</b>
<b>PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>1.Pacientes.....</b>	<b>33</b>
1.1 Evaluación del perfil inmunitario en pacientes con mieloma múltiple y linfoma en remisión completa de larga evolución posTASPE.....	33
1.2 Evaluación de las cadenas pesadas ligeras como predictor de recaída en pacientes con mieloma múltiple posTASPE.....	33
<b>2.Muestras.....</b>	<b>34</b>
<b>3.Materiales .....</b>	<b>35</b>
3.1 Anticuerpos monoclonales para el estudio del inmunofenotipo.....	35
<b>4.Métodos .....</b>	<b>35</b>
4.1 Hemograma .....	35
4.2 Inmunofenotipo en sangre periférica mediante citometría de flujo multiparamétrica ....	35
4.2.1. Preparación de la muestra de sangre periférica .....	36
4.2.2. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.....	36
4.3 Inmunofenotipo en médula ósea mediante citometría de flujo multiparamétrica .....	39
4.3.1 Preparación de la muestra de médula ósea.....	39
4.4 Citología y alteraciones genéticas en médula ósea .....	40
4.5 Análisis de parámetros séricos .....	40

4.5.1	Parámetros bioquímicos .....	40
4.5.2	Inmunoglobulinas totales e isotipo de las inmunoglobulinas.....	41
4.5.3	Proteinograma y cuantificación del componente monoclonal.....	41
4.5.4	Cadenas ligeras libres .....	41
4.5.5	Cadenas pesadas ligeras .....	41
4.5.6	Cálculo del incremento relativo de inmunoglobulinas totales y cadenas pesadas ligeras .....	41
<b>5.</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>42</b>
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>43</b>
<b>1.</b>	<b>Evaluación postrasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de la reconstitución inmunitaria en pacientes con mieloma múltiple, en pacientes con linfoma en remisión completa de larga evolución y en pacientes con mieloma múltiple en remisión completa corta. ....</b>	<b>45</b>
1.1	Características de los pacientes .....	45
1.1.1	Pacientes MM-LTCR .....	45
1.1.2	Pacientes MM-SCR.....	46
1.1.3	Pacientes LF-LTCR.....	47
1.2	Enfermedad mínima residual en médula ósea en los pacientes MM-LTCR mediante citometría de flujo multiparamétrica.....	47
1.3	Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en los pacientes MM-LTCR .....	50
1.3.1.	Caracterización de linfocitos T.....	50
1.3.2.	Caracterización de linfocitos B .....	54
1.3.3.	Caracterización de células NK .....	56
1.4	Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de los pacientes MM-SCR .....	58
1.4.1.	Caracterización de linfocitos T.....	58
1.4.2.	Caracterización de linfocitos B .....	60
1.5	Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en los pacientes LF-LTCR .....	62

1.5.1. Caracterización de linfocitos T.....	62
1.5.2. Caracterización de linfocitos B .....	64
<b>2.Evaluación de las cadenas pesadas ligeras como factor de riesgo de recaída en pacientes con mieloma múltiple sometidos a TASPE .....</b>	<b>66</b>
2.1. Estudio de las cadenas pesadas ligeras en los pacientes con mieloma múltiple IgG .....	66
2.2. Cadenas pesadas ligeras en pacientes con mieloma múltiple IgA .....	69
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>73</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>89</b>
<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>111</b>

## ***ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS***

<u>Figura 1:</u> Estructura de una Inmunoglobulina.....	8
<u>Figura 2:</u> Ontogenia de un linfocito T.....	10
<u>Figura 3:</u> Ontogenia de un linfocito B.....	12
<u>Figura 4:</u> Ensayo de cadenas pesadas ligeras .....	15
<u>Tabla 1:</u> Nuevos criterios diagnósticos en mieloma múltiple. ....	16
<u>Tabla 2:</u> Translocaciones más frecuentes en mieloma múltiple clasificadas según el riesgo. ....	17
<u>Tabla 3:</u> Sistema de Estadaje Internacional Revisado en mieloma múltiple.....	18
<u>Tabla 4:</u> Características de las principales técnicas disponibles para la detección de enfermedad mínima residual.....	21
<u>Tabla 5:</u> Criterios de respuesta y progresión en pacientes con mieloma múltiple según el IMWG. ....	23
<u>Tabla 6:</u> Panel consenso de los criterios de respuesta en pacientes con mieloma múltiple. ....	23
<u>Tabla 7:</u> Panel de anticuerpos monoclonales para el estudio de sangre periférica.....	35
<u>Tabla 8:</u> Panel de anticuerpos monoclonales para el estudio de médula ósea.....	35
<u>Figura 5:</u> Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.. ....	38
<u>Figura 6:</u> Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica. ....	38
<u>Figura 7:</u> Estrategia de análisis para el estudio de la enfermedad mínima residual en médula ósea.....	40
<u>Tabla 9:</u> Características de los pacientes MM-LTCR. ....	46
<u>Tabla 10:</u> Características de los pacientes MM-SCR.....	47
<u>Tabla 11</u> Estudio de enfermedad mínima residual en médula ósea en los pacientes MM-LTCR analizados.....	48
<u>Tabla 12:</u> Niveles de inmunoglobulinas en suero, cadenas pesadas ligeras y el cociente cadenas pesadas ligeras en los pacientes MM-LTCR.....	49
<u>Figura 8:</u> Distribución de las subpoblaciones de linfocitos T-CD4 <sup>+</sup> y linfocitos T-CD8 <sup>+</sup> en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-LTCR al cabo de un año y de los controles sanos de edades parecidas .....	51
<u>Figura 9:</u> Distribución de los linfocitos T de memoria central en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-LTCR al cabo de un año y de los controles sanos de edades parecidas.....	52
<u>Figura 10:</u> Distribución de la subpoblación de linfocitos T reguladores en sangre periférica de	



los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-LTCR al cabo de un año y de los controles sanos de edades parecidas. ....	53
<u>Figura 11:</u> Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-LTCR al cabo de un año y de los controles sanos de edades parecidas. ....	55
<u>Figura 12:</u> Expresión de los receptores activadores e inhibidores de las células NK en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-LTCR al cabo de un año y de los controles sanos de edades parecidas. ....	57
<u>Figura 13:</u> Distribución de las subpoblaciones de linfocitos T-CD4 <sup>+</sup> y linfocitos T-CD8 <sup>+</sup> en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-SCR y de los controles sanos de edades parecidas. ....	59
<u>Figura 14:</u> Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-SCR y de los controles sanos de edades parecidas ....	61
<u>Figura 15:</u> Distribución de las subpoblaciones de linfocitos T-CD4 <sup>+</sup> y linfocitos T-CD8 <sup>+</sup> en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes LF-LTCR y de los controles sanos de edades parecidas. ....	63
<u>Figura 16:</u> Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes LF-LTCR y de los controles sanos de edades parecidas. ....	65
<u>Tabla 13:</u> Cuantificación de inmunoglobulinas totales IgG, cociente cadenas pesadas ligeras y cocientes cadenas ligeras libres en el suero de los pacientes con MM-IgG trasplantados al principio y al final del seguimiento. ....	67
<u>Figura 17:</u> Representación de los valores medios del ratio cadena involucrada/no involucrada y de los niveles de inmunoglobulina G totales en el suero de los pacientes al principio y al final del seguimiento en los grupos estudiados. ....	67
<u>Figura 18:</u> Evolución de los niveles de inmunoglobulina G totales, del ratio cadena involucrada/no involucrada y del cociente cadenas pesadas ligeras en un paciente representativo de cada uno de los grupos estudiados. ....	68
<u>Tabla 14:</u> Cuantificación de inmunoglobulinas A totales, cociente cadenas pesadas ligeras y cocientes cadenas ligeras libres en el suero de los pacientes con MM-IgG trasplantados al principio y al final del seguimiento. ....	69
<u>Figura 19:</u> Representación de los valores medios del ratio cadena involucrada/no involucrada y de los niveles de inmunoglobulina A totales en el suero de los pacientes al principio y al final del seguimiento en los grupos estudiados. ....	70

<u>Figura 20:</u> Evolución de los niveles de inmunoglobulina A totales, del ratio cadena involucrada/no involucrada y del cociente cadenas pesadas ligeras en un paciente representativo de cada uno de los grupos estudiados.....	71
---	----

## ***CLAVE DE ABREVIATURAS***

---

<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>AcMo</b>	Anticuerpo Monoclonal
<b>ADCC</b>	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, del inglés “Anti-body-dependent-cell-mediated cytotoxicity”
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>alo-TPH</b>	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
<b>cCLL</b>	Cociente cadenas ligeras libres (cadena libre $\kappa$ /cadena libre $\lambda$ )
<b>CLL</b>	Cadenas ligeras libres
<b>CD</b>	Células dendríticas
<b>CG</b>	Centro germinal
<b>cHLC</b>	Cociente cadena pesada isotipo $\kappa$ /cadena pesada isotipo $\lambda$
<b>CM</b>	Component monoclonal
<b>CMF</b>	Citometría de flujo
<b>CP</b>	Célula plasmática
<b>CPM</b>	Célula plasmática mielomatosa
<b>EMR</b>	Enfermedad mínima residual
<b>GL</b>	Ganglio linfático
<b>GMSI</b>	Gammapatía monoclonal de significado incierto
<b>HLC</b>	Cadenas pesadas-ligeras, del inglés “Heavy-light chains”
<b>IF</b>	Inmunofenotipo
<b>IFJ</b>	Inmunofijación
<b>Igs</b>	Inmunoglobulinas
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMIDs</b>	Inmunomoduladores
<b>IMWG</b>	<i>International myeloma working group</i>
<b>IP</b>	Inhibidor de proteasoma
<b>iRC</b>	Remisión completa inmunofenotípica
<b>LB</b>	Linfocitos B
<b>LF</b>	Linfoma
<b>LF-LTCR</b>	Pacientes con linfoma en remisión completa de larga evolución
<b>LT</b>	Linfocitos T
<b>LTCR</b>	Remisión completa de larga evolución, del inglés “Long-term complete remission”.
<b>MBRP</b>	Muy buena respuesta parcial
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad

<b>MM</b>	Mieloma múltiple
<b>MM-LTCR</b>	Pacientes con mieloma múltiple en remisión completa de larga duración (>6 años), del inglés “Long-term complete remission”.
<b>MM-SCR</b>	Pacientes mieloma múltiple en remisión completa de duración corta (<4 años)
<b>MO</b>	Médula ósea
<b>mRC</b>	Remisión completa molecular
<b>NA</b>	No aplicable
<b>ND</b>	No disponible
<b>NGF</b>	Citometría de flujo de nueva generación
<b>NGS</b>	Secuenciación genómica de nueva generación o secuenciación masiva
<b>NV</b>	No valorable
<b>OLS</b>	Órgano linfático secundario
<b>RC</b>	Remisión completa
<b>RI</b>	Respuesta inmunitaria
<b>rI/U</b>	Ratio cadena involucrada/no involucrada
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RP</b>	Respuesta parcial
<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SI</b>	Sistema Inmunitario
<b>SLP</b>	Supervivencia libre de progresión
<b>SMM</b>	<i>Smouldering</i> mieloma
<b>SP</b>	Sangre periférica
<b>sRC</b>	Remisión completa estricta
<b>T<sup>a</sup></b>	Temperatura
<b>TASPE</b>	Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
<b>TCR</b>	Receptor de célula T, del inglés “T-cell- receptor”
<b>Treg</b>	Células o linfocitos T reguladores
<b>β-2M</b>	β-2 microglobulina
<b>κ</b>	Kappa
<b>λ</b>	Lambda

## ***INTRODUCCIÓN***

## 1. **Mieloma múltiple: Definición**

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B caracterizada por una proliferación clonal incontrolada de células plasmáticas (CP) con una larga supervivencia en la médula ósea (MO), lo que produce una inmunoglobulina (Ig) monoclonal (o componente monoclonal; CM) en suero y/u orina. El cuadro clínico está caracterizado por la presencia de lesiones osteolíticas, insuficiencia renal, anemia e hipercalcemia. Representa el 10-15% de todas las neoplasias hematológicas y es la segunda neoplasia hematológica más frecuente después de los linfomas <sup>1</sup>. Según la SEER (*Surveillance Epidemiology and End Results*), en el año 2017 se estiman 30.328 nuevos casos (1.8% de los casos de cáncer en EEUU) y 12.590 defunciones (2.1% de las muertes por cáncer en EEUU) <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>).

La mediana de edad al diagnóstico es de 69 años y sólo excepcionalmente (0,6% de los casos) aparece antes de los 30 años de edad. Presenta una gran variabilidad geográfica y racial, con mayor incidencia en varones que en mujeres y en afroamericanos que en caucasianos <sup>2</sup>. Existen distintos tipos de MM según el isotipo del CM en suero y/u orina. El tipo IgG es el más frecuente (50-60%), seguido de los tipos IgA (20%) y de los MM de cadenas ligeras libres (CLL) (20%) <sup>3</sup>.

El MM se considera una enfermedad confinada a la MO, a pesar de que en un 7-18% de los casos de nuevo diagnóstico se detecta la presencia de enfermedad extramedular <sup>4</sup>. En la mayoría de los casos, por factores desconocidos, el MM evoluciona a partir de una gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) que es un estado asintomático presente en el 3-4% de la población mayor de 50 años caracterizada por la presencia de un CM en suero <3g/dL, <10% CP en MO y ausencia de daño orgánico <sup>2 5</sup>. La tasa anual de progresión de las GMSI es del 0.5-1%, dependiendo de distintos factores de riesgo <sup>6</sup>. Así, el riesgo de progresión del MM asintomático o *smouldering* mieloma (SMM) durante los primeros cinco años es del 10% <sup>7</sup>.

Se trata de una enfermedad con gran heterogeneidad clínica y biológica. Gracias al avance del conocimiento y, a pesar de que sigue siendo una enfermedad incurable, con los nuevos tratamientos estamos cada vez más cerca de su curación y/o de su transformación en una enfermedad crónica de larga duración <sup>8</sup>.

## 2. **Respuesta inmunitaria**

El sistema inmunitario (SI) está constituido por un conjunto de células y procesos biológicos que protegen al organismo de agentes extraños. Está mediado por: (1) una respuesta inmunitaria (RI) innata que es limitada en el tiempo, rápida e inespecífica, compuesta por una barrera fisicoquímica (epitelios), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), linfocitos citolíticos

naturales (células NK), proteínas del complemento y citocinas, y (2) una RI adaptativa, específica de antígeno (Ag), más tardía, de gran diversidad y que genera memoria, compuesta por los linfocitos y sus productos. Ambas respuestas están vinculadas y son fundamentales para un adecuado funcionamiento del SI <sup>9</sup>.

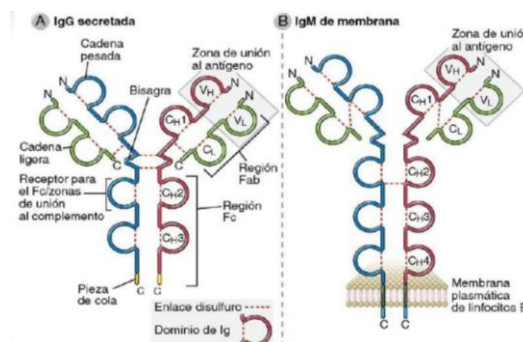
Dependiendo de su función, distinguimos principalmente dos tipos principales de linfocitos: (a) los linfocitos B (LB) secretadores de anticuerpos (Acs) y mediadores de la RI adaptativa humoral y (b) los linfocitos T (LT) mediadores de la RI adaptativa celular que a su vez se dividen en LT-CD8<sup>+</sup> con actividad citotóxica y en LT-CD4<sup>+</sup> cooperadores. Ambos tipos de linfocitos reconocen Ag específicos a través de sus complejos de membrana (BCR, del inglés “B-cell receptor” en los LB y TCR, del inglés “T-cell receptor” en los LT) y son las células responsables de la especificidad y memoria característica de la RI adaptativa.

## 2.1 Inmunidad adaptativa humoral

Se trata de una respuesta mediada por Acs en la que los LB maduros procedentes de la MO, tras el contacto con el Ag en los órganos linfoides secundarios (OLS), se activan y diferencian a CP productoras de Acs de larga supervivencia, o a LB de memoria capaces de sintetizar Acs de forma rápida ante una segunda exposición al Ag.

## 2.2 Estructura de una inmunoglobulina

Cada molécula de Ig, también denominada Ac, tiene una estructura simétrica compuesta por dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (L de “light”) y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (H de “heavy”) unidas entre sí por puentes disulfuros. Ambos tipos de cadenas tienen a su vez dos regiones distintas: una región variable (V) encargada del reconocimiento del Ag (región F<sub>ab</sub>) y una región constante (C) responsable de sus funciones efectoras (región F<sub>c</sub>) (figura 1).



**Figura 1: Estructura de una Inmunoglobulina.**

Adaptado de <sup>10</sup>. A) Representación de una Ig tipo IgG en su forma secretada. B) Representación de una Ig tipo IgM en membrana. La región de especificidad al antígeno viene determinada por la juxtaposición de región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) y por la región V de la cadena L (V<sub>L</sub>). La región constante de la cadena pesada determina la función de la Ig que puede encontrarse en forma secretada o libre (1A) o unida a la membrana (1B).



Atendiendo únicamente a las diferencias en la estructura de las regiones C de la cadena H, se distinguen 5 isotipos distintos de Igs (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), con propiedades fisicoquímicas y funciones efectoras distintas y, salvo la IgD, se pueden expresar también en forma secretada. Las regiones C de las cadenas L, idénticas en cada molécula de Ig, pueden ser tipo kappa ( $\kappa$ ) o lambda ( $\lambda$ ) y no participan en la función efectora de la Ig ni en su unión a la membrana.

La unión del Ag a las moléculas de Ac depende de las regiones hipervariables de las regiones V de las cadenas H y L de las Igs, también conocidas como regiones determinantes de la complementariedad que son las únicas implicadas en la especificidad antigénica <sup>10</sup>.

Las Igs de membrana forman el receptor para el Ag de los LB y ejercen su función en zonas lejanas a las células B que las producen ya que sus principales funciones son la neutralización del Ag y la opsonización del Ag para la activación del complemento, para la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos y para la citotoxicidad mediada por células NK (ADCC, del inglés “Antibody-dependent-cell-mediated-cytotoxicity”).

## 2.3 Inmunidad adaptativa celular

Sus principales agentes son los linfocitos y consta de los siguientes pasos: reconocimiento por parte de los LT vírgenes o *naïve* de los Ag presentados por células dendríticas (CD) en los OLS, la activación y proliferación del clon de linfocitos específicos para dicho Ag (expansión clonal), la diferenciación en células efectoras, la migración de los LT al foco antigénico y la eliminación del Ag <sup>10</sup>.

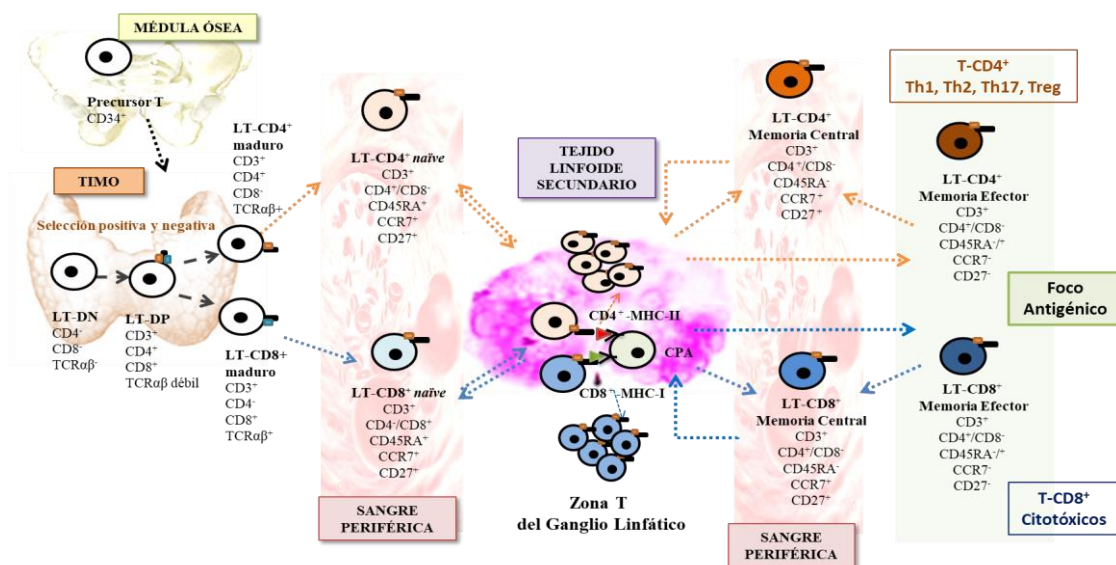
### 2.3.1 Linfocitos T

Los precursores inmaduros de los LT son células CD34<sup>+</sup> originadas en la MO que se liberan a la sangre periférica (SP) en oleadas y entran en el timo, donde completan su maduración y adquieren la capacidad de responder a Ags y eliminarlos. Tras un proceso de selección positiva y negativa en el timo, los LT *naïve* que reconocen con baja afinidad Ags propios presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) en los LT CD8<sup>+</sup> o por el MHC-II en LT CD4<sup>+</sup>, salen a SP donde recirculan por los OLS en búsqueda de su Ag. Cuando lo encuentran, se activan, proliferan y se diferencian, o bien a LT efectores que migran al foco antigénico donde activan a otras células inmunitarias y eliminan el Ag, y/o a LT de memoria central de larga supervivencia y funcionalmente quiescentes que son capaces de diferenciarse rápidamente a LT efectores ante una segunda exposición al Ag <sup>10</sup> (figura 2).

Los LT *naïve* que salen del timo hacia los OLS son células CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> que expresan el receptor de quimiocinas CCR7, el cual media su migración y entrada en los ganglios linfáticos (GL). Los LT de memoria central carecen de función efectora inmediata y mantienen la

expresión de CCR7 ya que recirculan a través de los GL en búsqueda de su Ag (LT de memoria central  $CD27^+CCR7^+CD45RA^-$ ). Los LT de memoria efectores incluyen las subpoblaciones  $CD45RA^+$  y  $CD45RA^-$  y migran preferentemente hacia los focos antigénicos donde eliminan al Ag (LT de memoria efectores  $CD27^-CCR7^-CD45RA^{+/-}$ )<sup>11 12</sup>.

La RI de los LT es desencadenada por el reconocimiento antigénico, señales de co-estimulación y señales mediadas por citocinas. Los LT cooperadores  $CD3^+CD4^+$  reconocen Ags presentados en el contexto de MHC-II por las células presentadoras de Ag que incluyen a las CD, macrófagos y LB. Tras su activación y expansión clonal, dependiendo de los estímulos presentes, se diferencian en tres subpoblaciones que se inactivan mutuamente: (a) LT-Th1 que a través de la síntesis de IFN- $\gamma$  facilitan la función de los LB, macrófagos y LT- $CD8^+$  en la respuesta frente a distintos patógenos; (b) LT-Th2 que sintetizan interleucina (IL)4 e IL-13 favoreciendo las reacciones inmunitarias mediadas por IgE y por células como eosinófilos, basófilos y mastocitos y (c) LT-Th17<sup>13</sup> que a través de la IL-17 y la IL-22 favorecen el reclutamiento y la activación de células del SI como los neutrófilos estimulando la secreción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-8).



**Figura 2: Ontogenia de un linfocito T.**

Subpoblaciones de linfocitos T clasificados según sus características inmunofenotípicas en médula ósea, timo, sangre periférica, tejido linfóide secundario y foco antigénico. MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad; CPA: Célula presentadora de antígeno; LT-DN: linfocito T doble negativo; LT-DP: linfocito T doble positivo.

Los LT citotóxicos  $CD3^+CD8^+$  tienen una actividad citotóxica frente a células nucleadas que expresan Ag en el contexto del MHC-I<sup>10</sup>. Su citotoxicidad está mediada principalmente por la exocitosis de gránulos que liberan perforina y granzima y/o por la unión de su receptor FasL al ligando Fas que activa caspasas provocando, en ambos casos, la apoptosis de la célula diana.

Cabe destacar a los LT-exhaustos, unos LT caracterizados por una sobreexpresión de moléculas inhibitoras como PD1 y CTLA4<sup>14</sup> que, como consecuencia de una exposición prolongada al Ag, pierden su capacidad efectora y disminuyen su secreción de citocinas como IL-2 o TGF- $\beta$ . En los procesos neoplásicos en general, se asocian a una persistencia y progresión de la enfermedad<sup>15</sup> y, en concreto en MM, se han descrito como marcadores de progresión<sup>16</sup>.

Mención aparte merecen los LT CD4<sup>+</sup> reguladores (LTreg), los cuales garantizan la tolerancia periférica y previenen de una RI excesiva. Expresan concentraciones elevadas del receptor de IL-2 (CD25<sup>+</sup>) y bajas del receptor de IL-7 (CD127<sup>-</sup>) y se distinguen principalmente dos tipos distintos: los LTreg tímicos o naturales que provienen del timo y los LTreg periféricos inducibles generados en los OLS. Su función es inhibir la activación y funciones efectoras de los LT convencionales a través de la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$  y/o mediante el contacto directo con LT.

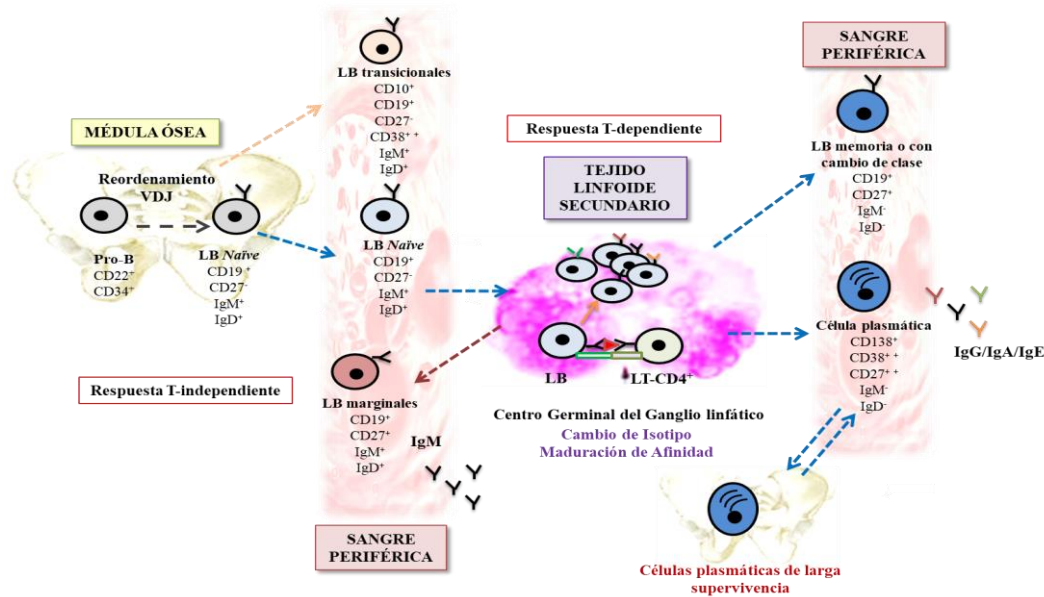
### 2.3.2 Linfocitos B

Según el estado de los genes de las Igs, y la expresión de sus proteínas de superficie e intracelulares, se identifican cinco estadios madurativos en la MO: pro-B, pre-BI, pre-BII, LB inmaduros y LB maduros *naïve*<sup>10 17</sup>. Estos LB *naïve* (CD20<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) salen de la MO y circulan por SP por los OLS hasta entrar en contacto con su Ag. Representan aproximadamente el 60-70% de los LB circulantes y expresan en su membrana IgM<sup>+</sup> e IgD<sup>+</sup>, ambas con la misma especificidad antigénica y sin mutaciones somáticas en su región V de su Ig de membrana.

Dependiendo del tipo de Ag, la RI humoral que se desencadena es distinta. En la respuesta timo dependiente (T-dependiente), los LB foliculares reconocen Ag proteicos en los OLS y migran a la región T del GL donde a través del MHC-II presentan el Ag a los LT CD4<sup>+</sup> cooperadores previamente activados por dicho Ag. Gracias a señales co-estimuladoras y a la secreción de citocinas (IL-2 IL-4 e IL-6), se estimula su proliferación y diferenciación. Tras el contacto, el LB migra al centro germinal (CG) del folículo, donde prolifera y sufre un proceso de cambio de isotipo de la cadena H de sus Igs que permite la síntesis de Acs con isotipos distintos<sup>18</sup> y un proceso de maduración de afinidad mediante hipermutación somática de las regiones V de las cadenas H y L, que aumenta la afinidad del Ac por el Ag<sup>19</sup> (figura 3).

Tras un proceso de selección positiva mediado por la presentación antigénica de las CD foliculares, los LB capaces de reconocer con alta afinidad el Ag abandonan el CG y se diferencian a células secretoras de Acs o CP, que migran a la MO donde mantienen una larga supervivencia y su capacidad de producción de Acs gracias a la interacción con el estroma medular<sup>20 21</sup>, o a LB de memoria que recirculan por la SP y son capaces de responder rápidamente mediante la secreción de Acs ante una segunda exposición al Ag. Estos LB de memoria, también llamados

con cambio de clase o “*Class-Switch*” ( $CD27^+IgM^+IgD^-$ ) suponen el 20-30% de los LB circulantes <sup>17</sup>.



**Figura 3: Ontogenia de un linfocito B.**

Subpoblaciones de linfocitos B (LB) en médula ósea, sangre periférica, tejido linfóide secundario y foco antigénico, clasificados según sus características inmunofenotípicas. CP: célula plasmática; Ig: inmunoglobulina.

En las respuestas T-independientes frente a Ag no proteicos, los LB marginales ( $CD27^+IgM^+IgD^+$ ) localizados principalmente en los senos marginales del bazo responden rápidamente a Ag extraños mediante la secreción de sus IgM de membrana de baja afinidad (Ac-naturales) <sup>22</sup>. Esta respuesta se produce en ausencia de LT cooperadores, los LB no sufren el cambio de isotipo ni la hipermutación somática.

Además de los estadios mencionados, en SP se detecta un grupo de células B inmaduras con un fenotipo similar a los LB naïve pero  $CD38^{++}CD10^+$ , que constituyen un 2-4% de los LB circulantes. Se trata de los LB transicionales, unas células que probablemente abandonan la MO antes de completarse el proceso de selección negativa como consecuencia de la incapacidad de la MO de retener a todas las células en sus últimos estadios madurativos <sup>23</sup>. Asimismo existe una pequeña población de CP en la SP, que corresponde a plasmablastos ( $CD27^{++}CD38^{++}$ ) recién generados que salen desde los OLS hacia la MO, mucosas o tejidos inflamados <sup>24</sup>.

### 2.3.3 Células Natural Killer

Son linfocitos capaces de eliminar de forma rápida células infectadas o tumorales. Representan aproximadamente el 10% de la población linfóide circulante y contribuyen a modular tanto la RI innata como la adaptativa. A diferencia de los LT, carecen de expresión de CD3 o TCR y ejercen su actividad citotóxica independientemente de la presentación antigénica por el

MHC. Son células  $CD3^+CD56^+CD16^+$  cuya actividad está regulada por el equilibrio entre las señales derivadas de receptores activadores (NKG2D y receptores citotóxicos naturales como Nkp30, Nkp44 o Nkp46) e inhibidores (NKG2C, NKG2A, KIRs del inglés “Killer-cell-receptors”). También ciertas IL (IL-12, IL-15 o IL-18) activan su capacidad citotóxica<sup>25</sup>

Sus mecanismos de activación incluyen: (a) la ADCC a través de la unión del fragmento Fc de los Abs a su receptor  $CD16^{10}$ ; b) la unión de sus receptores citotóxicos naturales (Nkp46, Nkp30), DNAM-1 y NKG2D a sus ligandos o (c) la identificación de la pérdida de expresión de MHC-I de las células alteradas a través de sus receptores KIR (teoría del “*Missing self*”)<sup>26</sup>.

### 3. **Patogenia del mieloma múltiple**

El origen de la célula tumoral del MM es una CP que reside en la MO que, tras un evento oncogénico inicial, se transforma y sufre una evolución clonal dirigida de un modo aleatorio y no lineal por eventos oncogénicos secundarios<sup>27</sup>. El microambiente medular y el SI son también fundamentales en la progresión de esta patología, al favorecer el crecimiento tumoral y permitir que la enfermedad escape de su control<sup>28 29</sup>.

#### 3.1 **Célula plasmática**

Las CP son células B completamente diferenciadas sin capacidad proliferativa, capaces de secretar Igs específicas de Ag. A pesar de que existen CP de supervivencia corta generadas a partir de células B pre-CG, las CP del MM son células B post-CG clonales de supervivencia larga que migran y residen en la MO. Las interacciones de la CP con las células estromales de la MO son fundamentales para esta migración, adhesión y larga supervivencia, ya que aquellas CP que no migran a la MO mueren pronto por apoptosis<sup>29 30</sup>.

En condiciones normales, representan un 2-4% de las células nucleadas de la MO y los marcadores utilizados en su identificación son  $CD38^{++}$  y  $CD138^+$ . El fenotipo de las CP normales es heterogéneo pero la mayoría son  $CD19^+CD20^-CD27^{+++}CD45^{+heterogéneo}CD56^-CD81^+$ . Por el contrario, las células plasmáticas mielomatosas (CPM) suele ser  $CD19^-CD27^{débil/-}CD45^{débil/-}CD56^+CD81^{débil/-}$  y a menudo expresan moléculas aberrantes como CD28, CD33 y CD117.

#### 3.2 **Eventos oncogénicos**

El evento oncogénico inicial en el LB maduro podría consistir en translocaciones del gen *IgH*, que directa o indirectamente, desregularían los genes de las ciclinas D<sup>27</sup>. Se proponen dos vías diferentes: (a) una para MM no hiperdiploides (43% de los casos) en los que el evento inicial sería la translocación entre el gen de la *IgH* en el cromosoma 14 y un oncogen como *MAF* y *MAFB* (t(14;16)), *MMSET* y *FGFR3* (t(4;14)), ciclinas D1 (t(11;14)) o D3 (t(6;14)), y (b) otra

para los MM hiperdiploides (50-60% de los casos) asociados mayoritariamente a trisomías de los cromosomas impares cuyo mecanismo es aún desconocido <sup>29</sup>. Estas alteraciones genéticas se han detectado también en pacientes con GMSI y/o SMM, lo que sugiere que se tratan de eventos iniciales necesarios pero no suficientes para el desarrollo del MM <sup>29</sup>. Posteriormente, en la CPM ocurren de manera aleatoria eventos oncogénicos secundarios <sup>31</sup> que favorecen la evolución de la enfermedad: activación de distintas rutas oncogénicas (ruta NF-κB), ganancia o pérdida de material genético, la aparición de cariotipos complejos con anomalías en c-MYC o mutaciones en genes supresores de tumores (*TP53*, *RBI*), oncogenes (*NRAS*, *KRAS* o *BRAF*) o en genes inhibidores de ciclina (*CDKN2A*, *CDKN2C*) <sup>29 27</sup>.

### 3.3 Microambiente medular

El microambiente medular es crucial en la progresión de la enfermedad y en la resistencia a fármacos <sup>29 32</sup>. Está formado por (a) un compartimento de células hematopoyéticas que incluye a las células del SI y células no hematopoyéticas (células estromales y células madre mesenquimales), (b) una matriz extracelular de proteínas que regula la distribución de los nichos celulares y (c) factores solubles como citocinas y factores de crecimiento que favorecen la migración, proliferación y adhesión de las CPM a la MO <sup>29, 33, 32</sup>.

De entre la gran red de interacciones complejas entre las CPM y el microambiente medular, cabe destacar a la IL-6, al factor activador de células B (BAFF) y al ligando inductor de proliferación (APRIL), producidos principalmente por las células estromales, neutrófilos y osteoclastos respectivamente, como los factores de crecimiento más importantes en la proliferación e inmortalidad de las CPM <sup>34</sup>. A su vez, estas CPM alteran el microambiente medular favoreciendo su crecimiento y diferenciación al a) inhibir la diferenciación de osteoblastos y favorecer la de los osteoclastos a través del sistema RANK/RANKL, b) promover la angiogénesis y c) favorecer la disfunción inmunitaria.

### 3.4 Inmunidad anti-tumoral

El MM posee una habilidad única de evadir la inmunovigilancia gracias a la disfunción inmunitaria asociada a la enfermedad y a un marcado ambiente inmunosupresor que permite que la enfermedad escape del control del SI. Esta inmunosupresión en el nicho del mieloma se debe a una producción continua de citocinas pro-inflamatorias, a un aumento de las células mieloides supresoras y de macrófagos asociados a tumor, y a un reclutamiento de células inmunosupresoras (Treg), que junto a la expresión de moléculas inhibitoras en las CPM, favorecen la anergia y el agotamiento de los LT, incapaces de eliminar las células tumorales <sup>29 33 35 36</sup>.

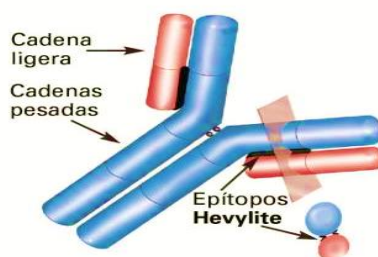
Todo ello, probablemente, justifique la disfunción inmunitaria descrita en pacientes con



MM: inversión del cociente  $CD4^+/CD8^+$ , alteración del balance Th1/Th2, defectos en la producción de citocinas, aumento de los Th17 y una disfunción de las células NK <sup>37</sup>. También se ha descrito una disminución del número de LB  $CD19^+$  y la presencia de inmunoparesia, una de las alteraciones más frecuentes en MM <sup>37</sup>.

Esta inmunoparesia, tradicionalmente definida como una disminución de los niveles de Ig policlonal por debajo del límite inferior de la normalidad, se ha asociado a un mayor riesgo de progresión en pacientes con SMM y a un peor pronóstico en pacientes de nuevo diagnóstico <sup>38</sup>. Asimismo, una recuperación de Ig policlonales (ausencia de inmunoparesia) al año del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE), se ha descrito recientemente como marcador de progresión y supervivencia <sup>39</sup>.

Actualmente está disponible un nuevo método nefelométrico/turbidimétrico, denominado cadenas pesadas ligeras (HLC, del inglés “heavy-light chains”) que, mediante el uso de Acs policlonales específicos frente a epítomos únicos de las regiones de unión entre las cadenas H y L, cuantifica los pares específicos de cadenas pesadas ligeras de cada Ig por separado (IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , IgM $\kappa$ , IgM $\lambda$ , IgA $\kappa$  e IgA $\lambda$ ) y sus cocientes (figura 4). Este nuevo test permite cuantificar la Ig no involucrada en el MM y establecer una nueva definición de inmunoparesia (ej.: disminución de la IgA $\lambda$  en un paciente con MM-IgA $\kappa$ ) que se ha asociado a un mayor riesgo de progresión de GMSI <sup>40</sup>, a un peor pronóstico en pacientes refractarios y de nuevo diagnóstico <sup>41</sup>, y a una menor supervivencia en pacientes con buena respuesta <sup>42</sup>.



**Figura 4: Ensayo de cadenas pesadas ligeras**

Diagrama de una inmunoglobulina (Ig) que muestra los epítomos únicos de las regiones de unión entre las cadenas pesadas y ligeras de una Ig frente a los que se dirigen los anticuerpos policlonales específicos del ensayo *Hevylite*. La cadena pesada de la Ig se muestra en azul; la cadena ligera en rojo. Adaptado de *Hevylite*® (The BindingSite, Birmingham, U.K.).

Asimismo, el cociente HLC (cHLC) se trata de un marcador de monoclonalidad que ha demostrado gran sensibilidad en la cuantificación del CM al diagnóstico y durante la monitorización de la respuesta al tratamiento <sup>43</sup>. A diferencia del cociente de CLL (cCLL  $\kappa/\lambda$ ), el cHLC no se ve alterado por la función renal ni por la presencia de bandas oligoclonales <sup>44</sup>, y facilita la monitorización del MM-IgA al eliminar el problema de su co-migración con otras proteínas séricas en la región  $\beta$  del proteinograma <sup>45,46</sup>.

#### 4. Clínica y diagnóstico del mieloma múltiple

El cuadro clínico característico del MM viene determinado por la presencia de los criterios CRAB (C: calcio sérico  $>11\text{mg/dL}$ ; R: insuficiencia renal con creatinina sérica  $>2\text{mg/dL}$ ; A: anemia: hemoglobina  $<10\text{g/dL}$ ; B: afectación ósea con lesiones líticas, fracturas patológicas u osteopenia severa <sup>47</sup>. Los síntomas clínicos son variados, siendo el dolor óseo y la fatiga los síntomas más comunes al diagnóstico (80% y 50% de los casos respectivamente) <sup>48</sup>. También se observa pérdida de peso (40%), fracturas óseas (30%), y con menos frecuencia, pueden aparecer complicaciones neurológicas (7-10%) y/o síndrome de hiperviscosidad (5-10%) <sup>48</sup>.

Una intervención temprana en pacientes con SMM de alto riesgo mejora la supervivencia global (SG) de los pacientes <sup>49</sup> por lo que, actualmente, para el diagnóstico de MM se ha añadido a los criterios CRAB <sup>47</sup>, una serie de biomarcadores asociados a un riesgo de progresión de SMM a MM de 80% en 2 años <sup>50</sup>.

Según los criterios establecidos por el “International Myeloma Working Group” (IMWG) <sup>50</sup>, a día de hoy, el diagnóstico se establece por la presencia de  $>10\%$  de CP en MO y/o de plasmocitoma óseo o extramedular comprobado por biopsia, junto con la presencia de síntomas CRAB o de al menos uno de los siguientes biomarcadores de malignidad, (a) criterios CRAB, (b)  $>60\%$  de CP en MO, (c) cCLL  $\kappa/\lambda \geq 100$  y (d)  $>1$  lesión focal detectada mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (tabla 1) <sup>50</sup>. No es necesaria la presencia de un nivel mínimo de CM en suero y/u orina, aunque su detección es importante para distinguir entre MM secretor y no secretor, los cuales representan un 3% de los MM <sup>51</sup>.

Nuevos Criterios Diagnósticos de MM del International Myeloma Working Group <sup>50</sup>	
Presencia de <u>células plasmáticas en MO <math>&gt;10\%</math> o plasmocitoma óseo o extramedular</u> comprobado por biopsia*, y uno o más de los siguientes eventos:	
<p>➤ <u>Eventos que definen MM (criterios CRAB):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hipercalcemia <math>&gt;0,25\text{mM}</math> (<math>&gt;1\text{mg/dL}</math>) por encima límite de referencia o <math>&gt;2,75\text{ mM}</math> (<math>&gt;11\text{mg/dL}</math>)</li> <li>▪ Insuficiencia Renal: creatinina en suero <math>&gt;177\text{ mM}</math> (<math>&gt;2\text{ mg/dL}</math>) o aclaramiento <math>&lt;40\text{ mL/min}</math></li> <li>▪ Anemia: Hemoglobina <math>2\text{ gr/dL}</math> por debajo del valor de referencia o un valor <math>&lt;10\text{ gr/dL}</math></li> <li>▪ Lesiones óseas: 1 o más lesiones osteolíticas por radiografía, TAC o PET-TAC</li> </ul> <p>➤ <u>Biomarcadores de Malignidad:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Células plasmáticas en MO <math>\geq 60\%</math></li> <li>▪ Ratio CLL** Involucrada/CLL No Involucrada en suero <math>\geq 100</math> siendo la involucrada <math>\geq 100\text{ mg/L}</math>.</li> <li>▪ <math>&gt; 1</math> lesión focal en el estudio de RMN ***</li> </ul>	
<p>c* Clonalidad comprobada por restricción <math>\kappa/\lambda</math> mediante inmunocitometría, inmunocitoquímica o inmunofluorescencia.</p> <p>** CLL: cadenas ligeras libres en suero con valores basados en el ensayo <i>FreeLyte</i> (TheBindingSite, Birmingham, UK).</p> <p>***La lesión de RMN ha de ser mínimo de 5mm.</p>	

**Tabla 1: Nuevos criterios diagnósticos en mieloma múltiple.** Adaptado de <sup>50</sup>. MO: médula ósea; CLL: cadenas ligeras libres; RMN: resonancia magnética nuclear.



## 5. Factores de riesgo y estadiaje del mieloma múltiple

Existe un gran número de marcadores pronósticos en MM<sup>52</sup>. Destacan:

### 5.1 Factores relacionados con las características de los pacientes

La SG en MM disminuye con la edad: pacientes >65 años tienen una SG de 4-6 años, siendo de hasta 10 en pacientes más jóvenes<sup>53</sup>. La fragilidad, la disfunción renal<sup>54</sup> y un modo rápido de presentación también se asocian a un peor pronóstico en MM<sup>55</sup>.

### 5.2 Factores relacionados con la biología de la enfermedad

- Cuantía e isotipo del CM: El MM-IgA está asociado a un peor pronóstico que el MM-IgG, probablemente debido a su asociación con la translocación t(4;14)<sup>56</sup>.

- Proliferación tumoral: un índice alto de proliferación detectado por citometría de flujo (CMF) multiparamétrica y niveles elevados de lactato deshidrogenasa se asocian a una menor SG<sup>57 58</sup>.

- Fenotipo de las CP y su presencia en SP: La cuantificación de CP y el ratio entre las CPM y las CP normales residuales así como determinados perfiles antigénicos se asocian a un peor pronóstico<sup>59</sup>.

- Enfermedad extramedular: es más prevalente en pacientes con genética de alto riesgo y en la era de los nuevos fármacos también se ha asociado con una menor SG<sup>52</sup>.

### 5.3 Factores relacionados con las alteraciones genéticas

Las alteraciones citogenéticas constituyen el principal factor pronóstico en MM. Su estudio es esencial ya que permiten estratificar a los pacientes según su riesgo y, en ocasiones, dirigen las decisiones terapéuticas<sup>52 60 61</sup> (tabla 2). Con respecto a las alteraciones moleculares, hasta la fecha sólo las mutaciones en el gen *TP53* se han asociado a un peor pronóstico<sup>62</sup>.

Riesgo estándar	Riesgo intermedio	Riesgo alto
Hiperdiploidía (50%) t(11;14) (15%) t(6;14) (5%)	Dup(1q) (35-40%) t(4;14) (15%)	del(17p) (10%) del (1p) (10%) t(14;16) (2-3%) t(14;20) (1%)

**Tabla 2:** Translocaciones más frecuentes en mieloma múltiple clasificadas según el riesgo.

Entre paréntesis se indica la frecuencia al diagnóstico de cada una de ellas (%).

### 5.4 Factores relacionados con la masa tumoral: Sistema de estadiaje

El esquema de estratificación del riesgo de Durie y Salmon (DS) basado en la relación entre la masa tumoral y el CM a través de modelos matemáticos<sup>63</sup>, ha sido completado por el Sistema de Estadiaje Internacional (ISS) que estratifica el riesgo según los niveles séricos de  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2-M) y de albúmina<sup>64</sup>.

En el año 2015 se propuso un modelo de estratificación de riesgo revisado más eficiente (R-ISS) que combina el sistema ISS con las alteraciones cromosómicas del(17p),t(4;14) y t(14;16)

y con los niveles de LDH permitiendo definir subgrupos de pacientes según su riesgo<sup>65 66</sup> (tabla 3).

Sistema de Estadiaje R-ISS del mieloma múltiple		Supervivencia a los 5 años	Mediana supervivencia (meses)
<b>R-ISS I</b>	Estadio ISS-I ( $\beta_2$ -M < 3,5 mg/L; albúmina >3,5 mg/dL), LDH normal y ausencia de citogenética de alto riesgo	82%	NR
<b>R-ISS II</b>	Estadio ISS-II ( $\beta_2$ -M <3,5 mg/L; albúmina <5 mg/dL o $\beta_2$ -M 3,5-5,5 mg/L solo ) y sin criterios para R-ISS-I o R-ISS-III	62%	83
<b>R-ISS III</b>	Estadio ISS-III ( $\beta_2$ -M >5,5 mg/L) con citogenética de alto riesgo o LDH alterado	40%	43

**Tabla 3: Sistema de Estadiaje Internacional Revisado en mieloma múltiple.**

Adaptado de<sup>64 65</sup>.  $\beta_2$ -M:  $\beta_2$ -microglobulina; LDH: lactato deshidrogenasa; ISS: Sistema Estadiaje Internacional; NR: no alcanzable.

### 5.5 Factores relacionados con la respuesta al tratamiento

La refractariedad al tratamiento se correlaciona con un peor pronóstico en MM. Diferentes grupos, entre ellos el grupo español, han mostrado que el nivel de profundidad de respuesta al tratamiento (enfermedad mínima residual (EMR) negativa) se correlaciona con el pronóstico, tratándose de un marcador subrogado de supervivencia<sup>67-69</sup>.

## 6. Tratamiento del mieloma múltiple

Desde los años sesenta, el tratamiento de MM se basó en la combinación de agentes alquilantes y corticoides (MP; melfalán-prednisona), con los que se conseguía una mediana de supervivencia de 2-3 años. Posteriormente, se introdujeron nuevas pautas de poliquimioterapia que, si bien mejoraron la tasa de respuestas, no consiguieron aumentar la SG<sup>70</sup>.

La introducción del TASPE en el año 1987, permitió no sólo aumentar la tasa de remisión completa (RC) sino también prolongar la supervivencia libre de progresión (SLP) y la SG en distintas series<sup>71</sup>, aunque no en todas<sup>72</sup>. A diferencia del trasplante alogénico (aloTPH), el TASPE se asocia a una baja mortalidad (<2-3%)<sup>73</sup>, a una tasa de RC del 40-60%<sup>67</sup> y a una mayor SLP frente a la quimioterapia convencional<sup>74</sup>. A día de hoy, es el tratamiento de elección en pacientes candidatos.

Desde hace unos años, la disponibilidad de fármacos inhibidores del proteasoma (IP) como el bortezomib, de inmunomoduladores (IMiDs) como la talidomida y la lenalidomida, y la posibilidad de combinar todos ellos, ha supuesto una mejora importante en términos de respuesta, SLP y SG en MM<sup>75</sup>. Cabe destacar a la lenalidomida, un IMiD que además de su acción antitumoral directa, posee mecanismos de acción pleiotrópicos; se trata de un fármaco anti-proliferativo, anti-angiogénico y anti-inflamatorio<sup>76</sup> que favorece la actividad citotóxica de los LT<sup>77</sup> y de las células NK<sup>78</sup>. Por su parte, el IP bortezomib, además de sensibilizar las células

tumorales a la apoptosis, tiene también un efecto modulador del SI del paciente <sup>79</sup>.

En los últimos años, son varios los fármacos que se han aprobado y/o comercializados en MM <sup>80</sup>: (a) El IP Carfilzomib, comercializado en algunos países para su uso en combinación con lenalidomida-dexametasona (RD) en pacientes en recaída o refractarios; (b) el IMID de 3ª generación Pomalidomida, aprobado en pacientes con MM en recaída y en combinación con dexametasona a bajas dosis en pacientes refractarios <sup>81</sup> y (c) el fármaco oral Panobinostat, un inhibidor de acetilasa de la vía del agregosoma, aprobado en el año 2015 en combinación con RD para el tratamiento de pacientes en recaída.

Actualmente, para la elección del tratamiento terapéutico se estratifican los pacientes en función de la edad y comorbilidades en:

(a) Pacientes NO candidatos a TASPE: pacientes >65-70 años o de menor edad con comorbilidades, en los que el objetivo es alcanzar una máxima respuesta minimizando la toxicidad asociada. El esquema más utilizado en nuestro medio es el desarrollado por el grupo español GEM/PETHEMA con VMP (bortezomib-melfalán-prednisona), que muestra una tasa de respuesta >70% (RC>30%), una mediana de SLP de 56 meses y una SG de casi 5 años <sup>82</sup>. También ha sido aprobado el empleo de lenalidomida y dosis ajustadas de dexametasona (Rd).

(b) Pacientes candidatos a TASPE: pacientes <65-70 años de edad sin comorbilidades, previo tratamiento de inducción que se describe a continuación.

### 6.1. **Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos: Fases**

#### Fase de inducción pre-trasplante

Se trata del tratamiento previo al TASPE cuya finalidad es erradicar la enfermedad de base y crear espacio en la MO para los nuevos progenitores hematopoyéticos. Aunque existen diferentes esquemas de inducción pre-trasplante <sup>83</sup>, se prefieren terapias combinadas triples con un IP y un IMID en sinergia <sup>84</sup>, siendo la terapia triple con VTD (bortezomib-talidomida-prednisona) y una tasa de respuesta >85% (RC>25%), el esquema recomendado por el grupo español <sup>85</sup>.

#### Fase de Movilización y Recogida de Progenitores Hematopoyéticos

La movilización de los progenitores hematopoyéticos se realiza en general con la toma de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) durante 4 días tras varios ciclos de inducción (entre el 3º y 4º ciclo), y se recogen mediante aféresis al menos  $2 \times 10^6$ /Kg células CD34<sup>+</sup>. Una descripción más detallada está disponible en diversos manuales y guías del Grupo Español de trasplante de progenitores hematopoyéticos y del Grupo Europeo ([www.getg.es](http://www.getg.es), [www.bmit.org](http://www.bmit.org)).

### Fase acondicionamiento y trasplante

Comprende desde el ingreso del paciente hasta la infusión de los progenitores hematopoyéticos. Su objetivo es acondicionar la MO y eliminar células cancerosas persistentes. El tratamiento con melfalán intravenoso a altas dosis (200mg/m<sup>2</sup>;Mel200) es el régimen más utilizado, siendo la combinación con busulfán (BuMel) una buena alternativa <sup>86</sup>. Una comparación de ambos esquemas es uno de los objetivos del actual Protocolo del Grupo GEM/PETHEMA 2015, aún sin conclusiones definitivas.

### Terapia de consolidación

Se trata de un tratamiento corto con el objetivo de incrementar la respuesta conseguida tras el trasplante. Actualmente se plantea en pacientes que no han alcanzado una RC posTASPE y la pauta recomendada es el esquema VTD o VRD <sup>87</sup>.

### Terapia de mantenimiento

Se trata de un tratamiento prolongado ( $\geq 12$  meses) cuyo objetivo es mantener la respuesta alcanzada y aumentar la SLP con la menor toxicidad posible. El mantenimiento con lenalidomida incrementa la SLP <sup>88</sup> y su uso en esta fase ha sido aprobado en Febrero de 2017 por la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Asimismo, el bortezomib también mejora la SLP y es eficaz en pacientes con riesgo intermedio/alto <sup>83</sup>.

## **6.2. Nuevas estrategias terapéuticas: Inmunoterapia**

### Anticuerpos monoclonales frente a Ag tumorales en mieloma múltiple

Dos anticuerpos monoclonales (AcMo) han sido recientemente aprobados, en combinación con lenalidomida y bortezomib en pacientes refractarios o en recaída: *Elotuzumab*, un AcMo anti-SLAMF7 que inhibe la interacción de las CPM con las células estromales de la MO <sup>89</sup> y activa la RI de las NK <sup>90</sup>, y *Daratumumab*, un AcMo anti-CD38 también aprobado para su uso en monoterapia <sup>91,92</sup>, que mejora la actividad ADCC y favorece la apoptosis y fagocitosis dependiente de Ac <sup>93</sup>.

### Anticuerpos dirigidos contra los “checkpoint” del sistema inmunitario

Un *checkpoint* es una molécula activadora o inhibidora capaz de modular la respuesta inmunitaria. En cáncer, en general, las moléculas CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) y PD-1 (*Programmed cell death 1*) son las que mayor relevancia clínica han demostrado. Se trata de dos moléculas inhibidoras cuyo bloqueo potencia la vigilancia inmunológica y evita la evasión inmune de la célula tumoral. En MM, se están llevando a cabo de ensayos clínicos que evalúan el tratamiento con el AcMo anti-PD-L1 (*Pembrolizumab*), recientemente aprobado en melanoma y cáncer de pulmón <sup>94</sup>.

### Receptores antigénicos quiméricos en células T específicos.

Las células con receptores antigénicos quiméricos (“CAR-T-cells”) son células T que expresan, además del TCR, una Ig de membrana capaz de reconocer la diana tumoral. En MM, las CAR-T-cells frente a un Ag de la célula B madura se encuentran en fase I de investigación <sup>95</sup>.

Otros fármacos como marizomib, opromozib, dinaciclib etc.<sup>96</sup>, y distintas estrategias como las terapias basadas en CD, vacunas y/o la infusión de LT <sup>97</sup>, se encuentran en investigación.

## **7. Enfermedad mínima residual**

Una (EMR) negativa es el factor pronóstico más importante en MM tanto en pacientes trasplantados <sup>68 69</sup> como en pacientes no trasplantados, independientemente de la edad y del riesgo <sup>98 99</sup>. Se asocia a una RC de larga evolución <sup>100 101</sup> y a una mayor SG <sup>102,103</sup>, y su adecuada monitorización permite la identificación de pacientes que incluso en RC tienen peor pronóstico y se beneficiarían de un tratamiento precoz <sup>104 105</sup>. La EMR se trata por tanto de un criterio esencial en la evaluación de la respuesta al tratamiento <sup>99 104</sup>.

Las principales características de las técnicas que actualmente están disponibles para el estudio de la EMR se muestran en la tabla 4<sup>104,106</sup>.

Parámetro	CMF (≥ 8 colores)	ASO-PCR	NGS de genes Igs	PET/CT
Aplicabilidad (%)	100	60-70	90	100*
Reproducibilidad	Alta	Alta	No reportada	Moderada en EMR
Disponibilidad	Alta	Intermedia	Limitada	Intermedia
Sensibilidad	10 <sup>-4</sup> -10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup> -10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	Alta (4mm)
Muestra	MO (<36h)	MO	MO o SP	NA
Tiempo	2-3 horas	≥ 5 días	≥ 7 días	2 horas
Necesidad de la muestra al diagnóstico	Importante (no imprescindible)	Imprescindible	Imprescindible	Importante (no imprescindible)
Muestra fresca	Necesaria (<36h)	No necesario	No necesario	NA
Muestra parcheada	Afecta	Afecta	Afecta	No afecta
Caracterización celular	Sí	No	No	No
Estandarización	En proceso (Euro-Flow)	Sí, desde hace 15 años (EuroMRD)	No reportada	No

**Tabla 4: Características de las principales técnicas disponibles para la detección de enfermedad mínima residual.** Adaptado de <sup>104 106</sup>. CMF: citometría de flujo; ASO-PCR; *allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction*; NGS: Secuenciación masiva, del inglés *Next Generation Sequencing*; PET/CT (*Positron emission tomography*); MO: médula ósea; SP: sangre periférica; NA: No aplicable; \*Sobre todo en enfermedad extramedular.

La CMF se trata de una técnica con buena sensibilidad (10<sup>-4</sup> o 10<sup>-5</sup>), reproducibilidad y utilidad pronóstica <sup>69,103,107</sup>. Para el estudio de EMR, el informe de 2008 del *European Myeloma Network* <sup>108</sup> y otras recientes publicaciones <sup>109,110</sup> recomiendan el análisis de al menos 2x10<sup>6</sup>

células totales y el uso de panel de Acs validados que incluyan el análisis de CD38, CD138 y CD45 en combinación con CD19, CD56, CD27, CD81, CD117, cIgκ y cIgλ. A pesar de éstos y otros esfuerzos realizados, la CMF se trata de una técnica no estandarizada, siendo ésta su principal limitación para su uso actual en la práctica clínica.

Recientemente se ha descrito la citometría de flujo de nueva generación (NGF) como una técnica rápida y muy sensible que supera las limitaciones de la CMF convencional <sup>111</sup>. Combina un panel optimizado de Acs, un procesamiento estandarizado de muestras y nuevas estrategias de análisis utilizando nuevos *softwares* que permiten un “gating” automático y la integración de la información de bases de datos de referencia. Se trata de una técnica estandarizada y preparada para su implementación en la práctica clínica <sup>111</sup>.

A diferencia de la CMF, las técnicas moleculares son fáciles de estandarizar y no requieren de una muestra fresca para el análisis, pero tiene dos inconvenientes principales que limitan su aplicabilidad clínica: el reordenamiento clonal y la gran heterogeneidad intraclonal del MM <sup>27</sup>. La técnica cuantitativa estandarizada ASO-PCR, a pesar de ser más sensible que la CMF, no es válida aproximadamente en un 30-40% de los pacientes debido la necesidad de oligonucleótidos específicos para cada clon de CP <sup>112</sup>. Aunque sin estar exenta, esta limitación se reduce con la secuenciación genómica de nueva generación o secuenciación masiva (NGS), la cual ha mostrado una aplicabilidad del 91% y una sensibilidad del  $10^{-6}$  <sup>68</sup>. Adicionalmente, una de las ventajas de la NGS es su capacidad de estudiar células tumorales circulantes en SP <sup>113,114</sup>, lo que facilitaría la monitorización de los pacientes evitando los problemas asociados al estudio de la MO mediante CMF y/o secuenciación, como la infiltración medular parcheada y/o la afectación extramedular. Aun así, son necesarios más estudios de validación y una mayor estandarización de la técnica. Por último cabe destacar dos técnicas novedosas en la evaluación de la EMR: el perfil de expresión génica (GEP del inglés *Gene Expression Profiling*) y la espectrometría de masas para la detección de las cadenas ligeras de Ig en SP <sup>115</sup>.

Actualmente, se recomienda estudiar la EMR mediante NGF y/o NGS, siempre indicando el nivel de sensibilidad asociado, en combinación con una técnica de imagen sensible capaz de detectar la presencia de enfermedad extramedular <sup>115 116</sup>.

## **8. Respuesta al tratamiento en mieloma múltiple**

En el año 2006 el IMWG incorpora a los criterios establecidos en 1998 <sup>117</sup>, el término de RC estricta (sRC) que añade a la definición previa de RC, la normalización del ratio κ/λ en suero y la ausencia de CP clonales en MO. Además, recoge y unifica como una muy buena respuesta parcial (MBRP) a las categorías MBRP (>90% de reducción de la paraproteína por electroforesis (EEF)) y a la categoría previa de “casi RC” (EEF negativa pero inmunofijación (IFJ) positi-

va) (tabla 5) <sup>118</sup>.

<b>REMISIÓN COMPLETA Estricta (sRC)</b>	Todos los criterios de la remisión completa Normalización del ratio $\kappa/\lambda$ Ausencia de CP clonales en MO por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia
<b>REMISIÓN COMPLETA (RC)</b>	IFJ negativa en suero y orina <5% CP en MO Desaparición de los plasmocitomas
<b>MUY BUENA RESPUESTA PARCIAL (MBRP)</b>	CM detectable en suero u orina por IFJ pero no por EEF o $\downarrow >90\%$ del CM sérico y <100mg/24h de paraproteína en orina
<b>RESPUESTA PARCIAL (RP)</b>	$\downarrow \geq 50\%$ del CM en suero $\downarrow$ del CM en orina/24h $\geq 90\%$ o hasta <200mg/24h
<b>ENFERMEDAD ESTABLE</b>	No se cumplen los criterios de los otros tipos de respuesta
<b>RECIDIVA CLÍNICA</b>	$\uparrow >25\%$ del CM o incremento absoluto >0,5g/dL $\uparrow >25\%$ de la paraproteína en orina/24h o >200mg/24h CP en MO >10% $\uparrow$ del tamaño de las lesiones óseas o plasmocitomas Aparición de nuevas lesiones líticas o plasmocitomas Hipercalcemia (>11,5mg/dL) no atribuible a otra causa

**Tabla 5: Criterios de respuesta y progresión en pacientes con mieloma múltiple según el IMWG.** Adaptado de <sup>118</sup>. EEF: electroforesis, IFJ: inmunofijación, CP: células plasmáticas, MO: medula ósea, CM: componente monoclonal,  $\uparrow$ : incremento,  $\uparrow$ reducción.

A día de hoy, es necesaria la normalización del cCLL mediante el test *Freelite*® (The Binding Site, UK) para poder establecer un estado de sRC <sup>118</sup>. Sin embargo, y aunque un estudio ha asociado esta normalización a un mejor pronóstico independientemente de la tasa de respuesta al tratamiento <sup>119</sup>, otros cuestionan su utilidad al mostrar que no mejora el pronóstico en los pacientes en RC <sup>120</sup>. Además, el cCLL se altera por la presencia de bandas oligoclonales <sup>44</sup>, las cuales se asocian a un mejor pronóstico en un 40% de los pacientes en RC postTASPE <sup>121</sup>.

Posteriormente, se estableció que la mayoría de las recaídas se deben a la presencia de una EMR y que aquellos pacientes con EMR positiva tienen una menor SLP <sup>68,103,122,123</sup>. Por tanto, dada la importancia del estudio de EMR en MM, se estableció un panel consenso que incorpora los siguientes dos nuevos estadios de RC: RC inmunofenotípica (iRC) y RC molecular (mRC) (tabla 6) <sup>124</sup>.

<b>REMISIÓN COMPLETA INMUNOFENOTÍPICA (iRC)</b>	Todos los criterios de sRC Ausencia de CP aberrantes en $10^6$ células en MO mediante CMF >4 colores
<b>REMISIÓN COMPLETA MOLECULAR (mRC)</b>	Todos los criterios de sRC Ausencia de CP clonales con sensibilidad $>10^{-5}$

**Tabla 6: Panel consenso de los criterios de respuesta en pacientes con mieloma múltiple.** Adaptado de. sRC: remisión completa estricta, CP: células plasmáticas, MO: medula ósea



## 9. **Reconstitución inmunitaria posTASPE**

La reconstitución inmunitaria tras el TASPE alude al restablecimiento de la homeostasis del tejido linfóide, y su importancia quedó demostrada con la observación de que una temprana recuperación del número total de linfocitos y de Igs policlonales posTASPE se asocian a una mayor SG en MM<sup>39 125 126 127</sup>.

A pesar de una pronta recuperación numérica de los niveles de LB y LT, la funcionalidad de los linfocitos permanece alterada durante un largo periodo de tiempo tras el TASPE, a excepción de las células NK cuyos número y función se restablecen de forma temprana<sup>128 129</sup>.

### 9.1 **Reconstitución de linfocitos B**

Tras el TASPE, los LB ‘recapitan’ su ontogenia<sup>130</sup>. El número de LB CD20<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> circulantes está disminuido durante los 3 primeros meses postrasplante<sup>129</sup>, momento en el que predominan LB circulantes poco diferenciados<sup>129</sup>. Los niveles de IgM, IgG e IgA se normalizan a los 6, 12-18 meses y 1-2 años respectivamente<sup>128 129</sup>.

Debido a defectos intrínsecos de los LB, al escaso número de LT-CD4<sup>+</sup> colaboradores posTASPE y a alteraciones del microambiente medular, la respuesta humoral está comprometida durante años. Todo ello, junto al menor número de mutaciones somáticas en individuos trasplantados<sup>129</sup>, favorece la aparición de infecciones incluso años después del trasplante<sup>128 131 129</sup>.

### 9.2 **Reconstitución de linfocitos T**

Existen dos vías que permiten la regeneración celular T posTASPE: (1) una vía extra-tímica causada por una expansión de los LT maduros infundidos en el producto de aféresis o de LT del receptor que se han mantenido tras la quimioterapia y (2) una regeneración tímica de LT que tiene lugar de una manera limitada debido a la edad de los pacientes y a la quimioterapia recibida<sup>128</sup>.

Los niveles de CD3<sup>+</sup> se normalizan a los 3 meses posTASPE, pero mientras los niveles de LT-CD4<sup>+</sup> permanecen bajos durante al menos un año, los niveles de LT-CD8<sup>+</sup> se recuperan durante los primeros meses como consecuencia de la expansión periférica de LT-CD8<sup>+</sup>. Esta expansión genera la inversión del ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> observada posTASPE, que parece mantenerse incluso tras 10 años del trasplante<sup>132</sup>. Se tratan de LT-CD8<sup>+</sup> de memoria y efectores de baja diversidad capaces de responder a citocinas (IL-2, IL-15, IL-17) y a Ag con los que previamente han entrado en contacto. Posteriormente se restablece la timopoyesis, y con ella, la recuperación a largo plazo de los LT CD4<sup>+</sup><sup>133</sup> y la regeneración de las células T *naïve* que aumentan a su vez la diversidad de sus TCR. Esta recuperación de la timopoyesis es dependiente de la edad de los pacientes<sup>133</sup>, y puede ocurrir que los pacientes nunca consigan recuperar los niveles de LT *naï-*



ve preTASPE <sup>134 132</sup>.

Por su parte, durante el primer mes postTASPE los LTregs disminuyen y los LT-CD8<sup>+</sup> aumentan lo que explica la temprana disminución del ratio LTreg/CD8<sup>+</sup> observada que se normaliza a los 3 meses aproximadamente <sup>16</sup>.

### **9.3 Reconstitución de células NK**

Con respecto a las células NK y a diferencia de las subpoblaciones linfocitarias T, su maduración puede ocurrir en ausencia del timo. La recuperación de sus niveles y de su actividad es muy temprana ya que ocurre a los 15-30 días postTASPE aproximadamente <sup>128</sup>. Este hecho las convierte en una de las dianas más prometedoras de la inmunoterapia actual <sup>135</sup>.

## **10. Nuevos biomarcadores en mieloma múltiple**

Un biomarcador se define como cualquier característica o parámetro que de manera objetiva y reproducible, sirve como un indicador de enfermedad biológica o de respuesta al tratamiento. En MM tienen especial relevancia porque las respuestas al tratamiento son muy heterogéneas y más del 50% de las recaídas son biológicas y ocurren sin datos clínicos de la enfermedad <sup>136 137</sup>. Como ya se ha mencionado en el apartado de EMR, debido a su asociación con una mayor SLP y SG, es fundamental disponer de biomarcadores que, de forma precoz, nos ayuden a detectar recaída y predecir la calidad y profundidad de la respuesta.

### **10.1 Biomarcadores del sistema inmunitario**

Una recuperación del valor absoluto de linfocitos (ALC, del inglés “absolute lymphocyte count”) se ha asociado a una mayor SG no sólo en pacientes con MM trasplantados <sup>126</sup> sino también en pacientes de nuevo diagnóstico <sup>138</sup>, lo que evidencia de nuevo la importancia de la reconstitución inmunitaria en la duración y calidad de la respuesta. Recientemente, se ha propuesto el ratio ALC/valor absoluto de monocitos (AMC, del inglés “absolute monocyte count”) como un marcador más robusto que el ALC, al asociarse un ratio elevado a una mayor SG al diagnóstico. Asimismo, una disminución del ratio ALC/AMC se ha correlacionado con una citogenética de alto riesgo (del17p y t(4;14)), pudiendo resultar también útil en la estratificación de pacientes con MM <sup>139</sup>.

En general, los pacientes con neoplasias presentan un aumento de LTregs y de células proinflamatorias (Th17) <sup>140</sup>. En MM un mayor número de LTregs y un aumento del ratio Treg/Th17 en la SP y MO se han postulado como marcadores de progresión <sup>141</sup>, y se ha propuesto la disminución del ratio Treg/Th17 como un biomarcador favorable del control inmunitario en pacientes con MM en RC de larga evolución (>10 años) <sup>142</sup>. También el ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en la SP de los pacientes podría tratarse de un biomarcador en MM por estar disminuido en las

fases tempranas y avanzadas de la enfermedad y a medida que progresa la misma <sup>143,144</sup>. También se ha propuesto a los LT exhaustos como un marcador precoz de recaída al observarse un aumento de los mismos a los 3 meses del TASPE en pacientes en recaída, antes de la aparición de los síntomas clínicos <sup>16</sup>.

Por su parte, el ensayo HLC parece tener un enorme potencial no sólo en la cuantificación del CM y en la monitorización de los pacientes en RC, sino también en la evaluación de la competencia inmunitaria, tal y como propone *Tovar N. et al* en un estudio realizado en 37 pacientes con MM trasplantados <sup>145</sup>. Asimismo, un aumento de la cadena involucrada junto a una supresión de la cadena no involucrada, reflejado en el aumento del ratio cadena involucrada/cadena no involucrada (rI/U, del inglés “ratio involved/uninvolved”) (ejemplo: IgGλ/IgGκ en un MM-IgGλ), se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes con GMSI <sup>40</sup> y se ha propuesto como un biomarcador de evolución a MM en un estudio realizado en 89 pacientes con GMSI <sup>146</sup>.

También el cCLL se ha descrito como un marcador importante en la detección precoz de recaídas <sup>147</sup>. Recientemente, y aunque en un reducido número de pacientes con MM en RC, la alteración de los niveles de CLL y del cCLL preTASPE y postTASPE se ha asociado a una progresión más temprana y a un pronóstico más desfavorable en MM, respectivamente <sup>148</sup>. Asimismo, se ha sugerido su utilidad en la estratificación del riesgo en pacientes con EMR negativa por CMF, probablemente gracias a su capacidad de evaluar una recuperación inmunitaria ineficiente <sup>149</sup>. Por tanto, son necesarios más estudios de validación para la identificación de pacientes trasplantados en RC que recaerán y que se beneficiarían de una terapia precoz <sup>148</sup>.

## 10.2 Biomarcadores moleculares

Determinados **perfiles de expresión génica** parecen ser también de utilidad en la identificación de pacientes con MM trasplantados con alto riesgo de recaídas y/o de pacientes con baja SG <sup>150</sup>. Los micro-RNAs en SP están cobrando cada vez más importancia en MM y seguramente serán buenos marcadores diagnósticos y pronósticos en un futuro no muy lejano <sup>151 152</sup>.

## 10.3 Biomarcadores de imagen

Por último, las nuevas técnicas de RMN y de PET-TAC permiten evaluar con mayor precisión el estado de RCs. La presencia de hallazgos negativos en estos estudios se correlaciona con una mayor SG y SLP, estando aceptado su uso como biomarcador de imagen de seguimiento por parte del IMWG, sobre todo en los pacientes con MM no secretores <sup>153</sup>.

Sin duda, en un futuro próximo y gracias a los avances tecnológicos y a la identificación de nuevos biomarcadores en MM, los esquemas de tratamiento y la monitorización de la respuesta terapéutica serán personalizados, lo que nos permitirán prolongar la SG de los pacientes con MM y contribuir a la curación de la enfermedad.

## ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

Las respuestas terapéuticas en MM son muy heterogéneas, desde pacientes que recaen al año del trasplante hasta pacientes que permanecen en RC durante más de 10 años. Por tanto, es fundamental disponer de biomarcadores que nos permitan individualizar la terapia, monitorizar eficazmente la respuesta y mejorar la supervivencia.

## **1. Hipótesis de trabajo**

**1.1.** Los pacientes con MM en RC de larga duración (MM-LTCR) sometidos a TASPE han alcanzado una reconstitución inmunitaria especial que condiciona la calidad y duración de la respuesta al tratamiento.

**1.2.** La inmunoparesia condiciona la calidad de la respuesta y podría tratarse de un marcador precoz de recaída en pacientes con MM en RC posTASPE

## **2. Objetivos**

**2.1** Evaluar si los pacientes con MM-LTCR presentan un perfil inmunitario característico y estable en el tiempo que, junto a una EMR negativa, pudiera asociarse a la calidad de su respuesta terapéutica al TASPE. Para ello se analizarán:

- i. Distribución de las distintas subpoblaciones linfocitarias T, B y NK en SP en pacientes con MM-LTCR y en los mismos pacientes al cabo de un año.
- ii. Grado de inmunoparesia y de competencia inmunitaria mediante la cuantificación de las cadenas pesadas ligeras (HLC).

**2.2** Determinar en qué momento aparece este perfil inmunitario inmunitario de pacientes MM-LTCR posTASPE.

**2.3** Determinar si el perfil inmunitario de pacientes MM-LTCR trasplantados es específico de MM o si aparece también en pacientes trasplantados por otras patologías hematológicas que se encuentran en RC de larga duración.

**2.4** Analizar la utilidad del ensayo HLC en la predicción de recaídas y duración de la respuesta, en pacientes con MM en RC posTASPE.

## ***PACIENTES Y MÉTODOS***

## 1. Pacientes

### 1.1 Evaluación del perfil inmunitario en pacientes con mieloma múltiple y linfoma en remisión completa de larga evolución posTASPE

Con el objetivo de evaluar si existe alguna relación entre el perfil inmunitario y el estado de LTCR, se incluyeron 20 pacientes con MM en RC durante al menos seis años posTASPE (grupo MM-LTCR), reclutados aleatoriamente en distintos tiempos postrasplante y sin evidencia de enfermedad autoinmune. Según los criterios establecidos por el grupo IMWG<sup>118</sup>, se incluyeron 18 pacientes con MM en sRC, 1 paciente en MBRP y 1 paciente en RP mantenida de larga evolución. Todos los pacientes fueron diagnosticados, trasplantados y tratados en el Hospital Universitario de La Princesa durante los años 1995 y 2012. Como controles, se incluyeron 15 donantes sanos, tanto hombres como mujeres y de edades parecidas a los pacientes MM-LTCR reclutados (50-70 años).

Con el fin de determinar si el patrón inmunitario se mantenía estable en el tiempo se repitió el estudio en los mismos pacientes MM-LTCR al cabo de un año. Asimismo, para determinar en qué momento aparece este perfil inmunitario, se estudiaron 8 pacientes con MM trasplantados en el Hospital Universitario de La Princesa entre los años 2012-2014, que se encontraban en RC de más de un año de duración pero menos de 4 años (pacientes con MM en RC corta; grupo MM-SCR).

Posteriormente, con el fin de determinar si el patrón inmunitario en pacientes MM-LTCR es específico de MM o si bien aparece en pacientes LTCR posTASPE para otras patologías, se incluyeron 10 pacientes trasplantados por linfoma que se encontraban en RC durante al menos 5 años posTASPE (grupo LF-LTCR). Los pacientes fueron diagnosticados, tratados y sometidos a TASPE en el Hospital Universitario de La Princesa entre los años 2008-2010.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético (CEIC) del Hospital Universitario de La Princesa. Todos los pacientes fueron debidamente informados y firmaron el consentimiento informado correspondiente.

### 1.2 Evaluación de las cadenas pesadas ligeras como predictor de recaída en pacientes con mieloma múltiple posTASPE

En colaboración con el Hospital Universitario Ramón y Cajal y con el fin de estudiar la utilidad del ensayo HLC como marcador de recaída, se llevó a cabo un estudio retrospectivo en 44 pacientes con MM sometidos a TASPE en el Hospital Universitario de La Princesa o en el Hospital Universitario Ramón y Cajal. Desde el momento del TASPE y durante  $29 \pm 3,8$  meses se realizó un seguimiento periódico de los pacientes hasta su recaída. Se consideran pacientes en recaída todos aquellos que, después de haber alcanzado una respuesta parcial o completa, pre-

sentaron signos clínicos de enfermedad.

Al final del periodo de seguimiento, en función de los criterios establecidos por el IMWG<sup>118</sup>, distinguimos 3 grupos de pacientes: (1) grupo de pacientes en RC, (2) grupo de pacientes en RP y (3) grupo de pacientes en recaída. En cada grupo, la muestra basal corresponde a la primera muestra disponible posTASPE, y la muestra final corresponde a la última muestra del seguimiento en los grupos RC y RP, y a la última muestra pre-recaída disponible en el grupo de pacientes en recaída.

En cada uno de los grupos se cuantificaron, en el momento basal y en el momento final o pre-recaída, las Igs totales (mg/dL) y el rI/U (ej:  $\text{IgG}\lambda/\text{IgG}\kappa$  en un MM-IgG $\lambda$  e  $\text{IgG}\kappa/\text{IgG}\lambda$  en un MM-IgG $\kappa$ ) en suero, y se calculó la media y desviación estándar (media  $\pm$  SD) de dichos parámetros en cada grupo. Se calcularon también los cocientes cHLC ( $\text{IgG}\kappa/\text{IgG}\lambda$  o  $\text{IgA}\kappa/\text{IgA}\lambda$ ) y cCLL (cadena  $\kappa$  libre/ $\lambda$  libre).

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario de La Princesa y del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Todos los pacientes fueron debidamente informados y firmaron el consentimiento informado correspondiente, aprobado por el CEIC de cada Centro.

## **2. Muestras**

En los pacientes MM-LTCR, LF-LTCR, MM-SCR y controles se obtuvieron dos muestras de SP en dos tubos de 5 mL con anticoagulante EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético). Una de ella se transportó a temperatura ( $T^a$ ) ambiente al laboratorio de Análisis Clínicos y la otra, en las mismas condiciones, al laboratorio de Inmunología. Si las muestras no se analizaban de inmediato, se guardaban a 4°C durante un máximo de 24 horas.

En la misma extracción, se obtuvo una muestra de SP en un tubo de 10 mL sin anticoagulante que se centrifugó durante 20 minutos a 2000 g para la obtención del suero. Se alicuotó, identificó y se guardó el suero de cada paciente en un congelador de -80°C. Este mismo procedimiento se llevó a cabo periódicamente desde el tercer mes del TASPE hasta la recaída o finalización del estudio, en los pacientes con MM trasplantados en seguimiento.

Con el fin de confirmar el estado de sRC<sup>118</sup> en los 18 pacientes MM-LTCR y la ausencia de plasmocitosis (>5%CP) en MO en los pacientes en MBRP y RP, se llevó a cabo un estudio de EMR mediante CMF y citología. Tras la firma del consentimiento informado, se realizó una punción lumbar y se transfirió la muestra de MO a dos tubos con EDTA en una proporción 2:10 (0.2 mL de EDTA por cada mL de MO). Igual que con las muestras de SP, una de las muestras se transportó a  $T^a$  ambiente al laboratorio de Hematología y la otra muestra se envió, en las mismas condiciones, al laboratorio de Inmunología del Hospital de la Princesa. Si no se anali-

zaban inmediatamente, las muestras se guardaban a 4°C durante no más de 24 horas.

### 3. Materiales

#### 3.1 Anticuerpos monoclonales para el estudio del inmunofenotipo.

El panel de AcMo utilizados para estudio del inmunofenotipo (IF) en SP y MO se muestra en las tablas 7 y 8, respectivamente.

<u>Sangre periférica</u>	<u>FITC</u>	<u>PE</u>	<u>PerCP</u>	<u>PECy7</u>	<u>APC</u>	<u>APC-H7</u>	<u>PB</u>
<b>Tubo linfocitos T</b> (Clon)	CD45RA (HI100)	CCR7 (1505003)	CD3 (SK7)	-	CD27 (MT271)	CD8 (SKI)	CD4 (RPA-T4)
<b>Tubo linfocitos B</b> (Clon)	IgD (IA6-2)	CD27 (L128)	CD38 (HIT2)	CD19 (SJ25C1)	IgM (G20-127)	CD10 (HI10a)	CD20 (2H7)
<b>Tubo NK-1</b> (Clon)	NKG2C (134591)	NKp46 (9E2)	CD3 (SK7)	NKG2D (1D11)	NKG2A (REA-110)	CD8 (SKI)	CD56 (B159)
<b>Tubo NK-2</b> (Clon)	DNAM-1 (11A8)	KIR2DL1/S1 (CH-L)	KIR2DL1 (HP-MA4)	CD3 (SK7)	KIR2DL4 (181703)	CD8 (SKI)	CD56 (B159)
<b>Tubo Treg</b> (Clon)	-	-	-	CD25 (BC-96)	CD127 (hIL-7R-M21)	CD3 (UCHT1)	CD4 (RPA-T4)

**Tabla 7: Panel de anticuerpos monoclonales para el estudio de sangre periférica.**

Estudio del inmunofenotipo por citometría de flujo multiparamétrica en sangre periférica. Entre paréntesis se indica el clon del anticuerpo utilizado

<u>Médula ósea</u>	<u>FITC</u>	<u>PE</u>	<u>PerCP</u>	<u>PECy7</u>	<u>APC</u>	<u>APC-AH7</u>
<b>Tubo 1</b> (Clon)	CD38 (90)	CD56 (MY31)	CD45 (2D1)	CD19 (SJ25C1)	CD138 (Mi15)	CD81 (JS-81)
<b>Tubo 2</b> (Clon)	CD38 (90)	CD28/CD117 (L293/104D2)	CD45 (2D1)	CD19 (SJ25C1)	CD138 (Mi15)	CD27 (M-T271)

**Tabla 8: Panel de anticuerpos monoclonales para el estudio de médula ósea.**

Estudio del inmunofenotipo por citometría de flujo multiparamétrica en médula ósea. Entre paréntesis se indica el clon del Ac utilizado.

Todos los AcMo fueron suministrados por Becton Dickinson (NJ, USA) salvo los seis AcMo siguientes: NKG2C, CCR7, KIR2DL1, KIR2DL4, NKG2A y CD20.

### 4. Métodos

#### 4.1 Hemograma

En las muestras de 5 mL de SP con EDTA enviadas al laboratorio de Hematología y en las 24 horas siguientes a la extracción, se realizó el hemograma mediante el contador automático Sysmex XT 1800i (Roche, Basilea, Suiza). El estudio incluía el análisis de la serie eritroide (hemoglobina (gr/dL), número de hematíes (millones/mm<sup>3</sup>) y volumen corpuscular medio (fl)), el análisis de la serie leucocitaria (miles/mm<sup>3</sup>, con su correspondiente fórmula leucocitaria) y el análisis de la serie plaquetar (miles/mm<sup>3</sup>).

#### 4.2 Inmunofenotipo en sangre periférica mediante citometría de flujo multiparamétrica

En las 24 horas siguientes a la extracción, se analizó el IF de las muestras SP enviadas al



laboratorio de Inmunología. Con la combinación de AcMo que se muestra en la tabla 7, se analizaron las subpoblaciones de LT, LB y células NK mediante CMF de ocho colores en el citómetro FACSCanto (Becton Dickinson, USA), previamente calibrado y compensado. La calibración del equipo se realiza empleando distintos tipos de microesferas y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la compensación del equipo se utiliza una muestra de SP marcada con las combinaciones de AcMo marcados en las fluorescencias indicadas en las tablas 7 y 8, y se ajustan las señales de fluorescencia y voltajes de cada detector con el fin de asegurar una discriminación adecuada entre las señales positivas y negativas.

Para cada tubo de SP se adquirieron 100.000 células totales según la ventana (o del inglés *gate*) tamaño/complejidad, salvo para el tubo Treg en el que se adquirieron 1.000.000 de células totales. En aquellos casos en los que una o más subpoblaciones linfocitarias eran muy escasas se procedió a continuar con la adquisición de la muestra hasta alcanzar un mínimo de 20 células en todas las subpoblaciones.

#### 4.2.1. Preparación de la muestra de sangre periférica

A partir de 100 µl de SP, se añadió la combinación de AcMo correspondiente a cada tubo, y se incubó durante 15 minutos en agitación. Tras la incubación, se añadieron 1.5 mL de solución lisante para romper los eritrocitos de la muestra y se incubó de nuevo en agitación durante 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente. Tras el lisado, se realizaron dos lavados con PBS en cada tubo. Tras el último lavado, se resuspendió el pellet de células en 200 µl de PBS quedando así la muestra preparada para ser analizada en el citómetro. Para el marcaje del tubo de LB, previo a la incubación con los AcMo, se realizaron dos lavados con 1 mL de PBS cada vez. Los volúmenes de AcMo utilizados se establecieron en base a los resultados de estudios previos de titulación.

#### 4.2.2. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica

En el siguiente cuadro se muestran los valores de normalidad de las distintas subpoblaciones linfocitarias en SP en sujetos adultos sanos, siendo el rango de normalidad de los valores absolutos de linfocitos totales de 1000-4000 linfocitos/µL de SP.

Subpoblación linfocitaria en SP	Porcentaje (%)	Valores absolutos (células/µL)
LT-CD4 <sup>+</sup>	35-55	400-1500
LT-CD8 <sup>+</sup>	10-30	200-1100
LB	5-15	200-600
Células NK	5-20	150-900

Definimos las distintas subpoblaciones linfocitarias con las siguientes combinaciones de AcMo:

#### Linfocitos T

LT	LT <i>naïve</i>	LT memoria central	LT de memoria efectores CD45RA <sup>-</sup>	LT de memoria efectores CD45RA <sup>+</sup>	Linfocitos Treg
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> 6 CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD27 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	CD27 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup>	CD27 <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup>	CD27 <sup>-</sup> CDR7 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> CD127 <sup>-</sup>

#### Linfocitos B

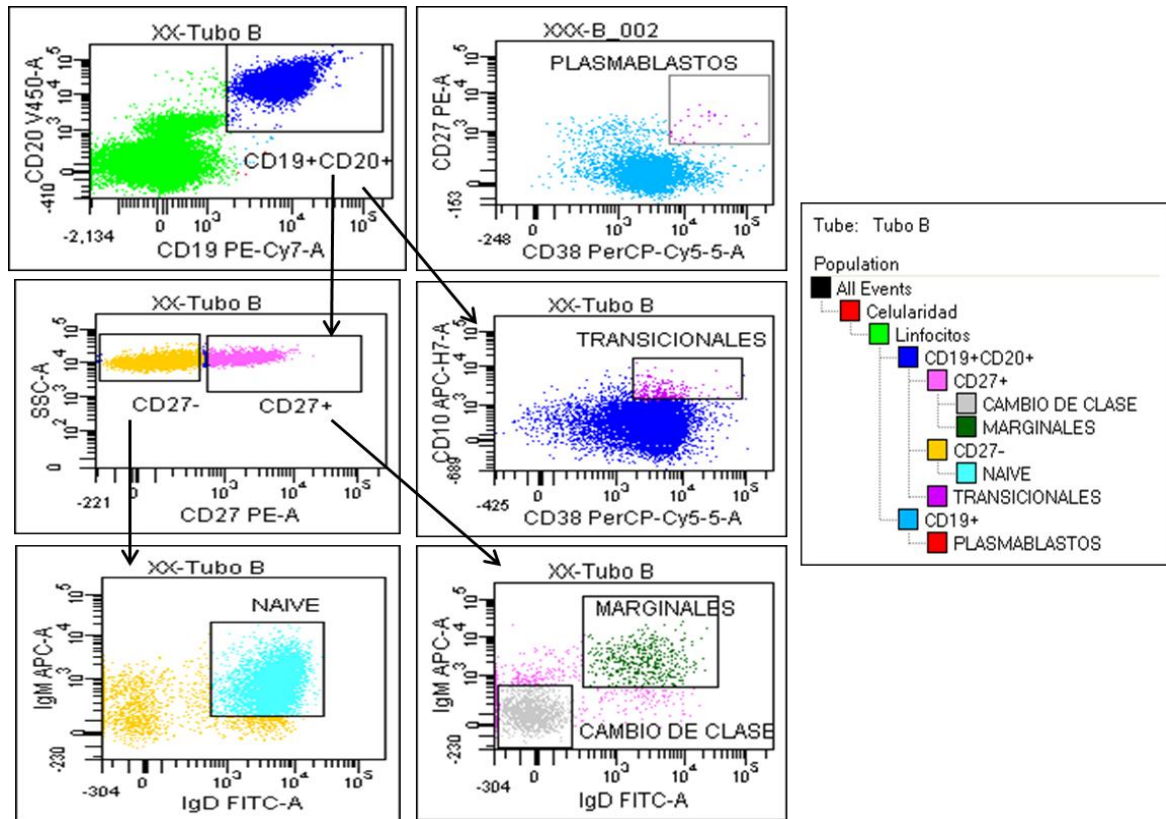
LB	LB <i>naïve</i>	LB memoria con cambio de clase	LB marginales	LB transicionales	Plasmablastos
CD19+CD20+	CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>	CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup>	CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>	CD27 <sup>-</sup> CD10 <sup>+</sup> CD38 <sup>++</sup>	CD27 <sup>++</sup> CD38 <sup>++</sup>

#### Células NK

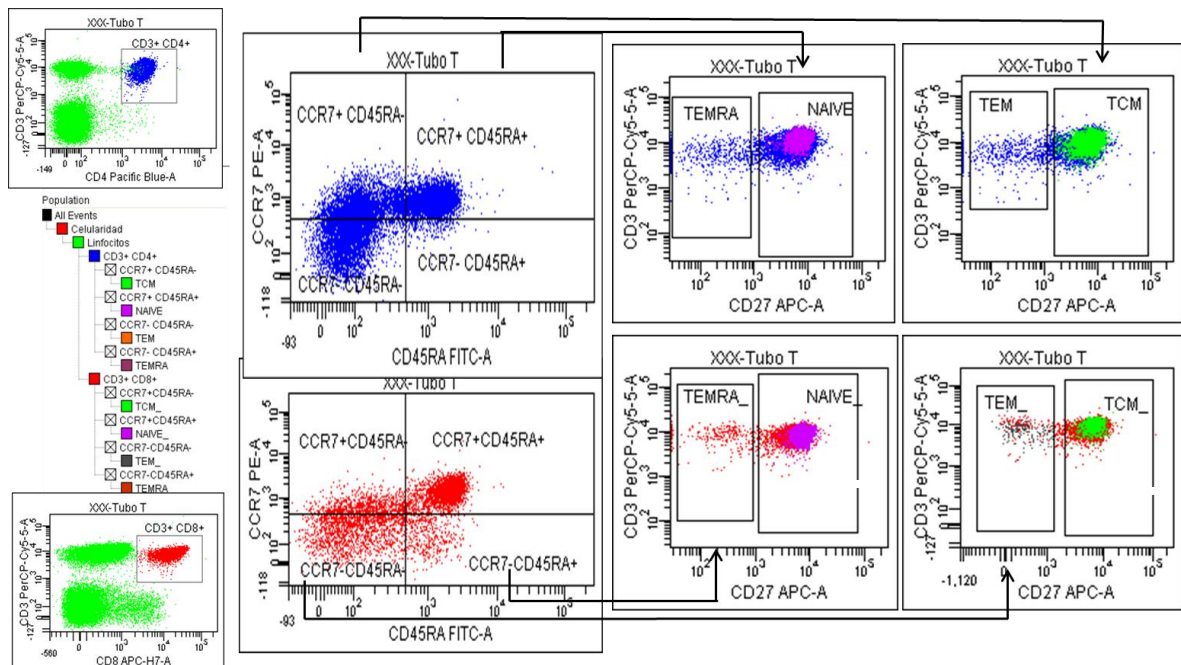
Se definen como CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> y se analiza la expresión de los siguientes receptores de membrana: NKG2A, NKG2C, NKp46, DNAM, KIR2DL1, KIR2DL1S1, NKG2D.

El análisis de las todas las distintas subpoblaciones linfocitarias en SP se realizó utilizando el programa de software DIVA (Becton Dickinson, USA). Para cada tubo, se generaron unas plantillas sobre las que se crearon los gráficos de puntos que nos permitieron seleccionar las distintas subpoblaciones linfocitarias mediante *gates*.

En las figuras 5 y 6 se muestra un ejemplo representativo de la estrategia de análisis de LB y LT respectivamente, en un paciente MM elegido aleatoriamente utilizando el software DIVA.



**Figura 5: Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica. Subpoblaciones de linfocitos B. Análisis realizado mediante el programa DIVA.**



**Figura 6: Estrategia de análisis para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica. Subpoblaciones de linfocitos T. Análisis realizado mediante el programa DIVA.**

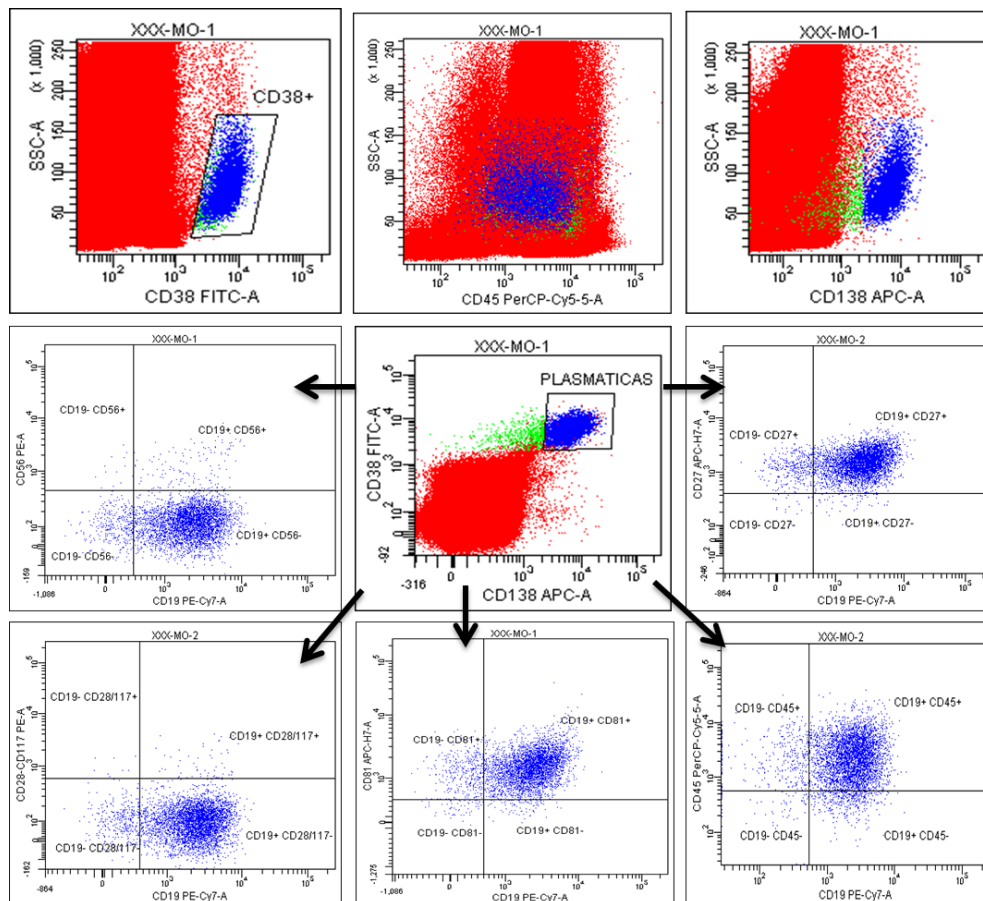
### 4.3 Inmunofenotipo en médula ósea mediante citometría de flujo multiparamétrica

El análisis de CMF en MO se llevó también a cabo en el citómetro FACS Canto (Becton Dickinson, USA), previamente calibrado y compensado. En cada tubo se adquirieron 5000 CP según el *gate* CD38<sup>+</sup>/CD138<sup>+</sup> o bien 2.000.000 de eventos según el *gate* tamaño/complejidad.

#### 4.3.1 Preparación de la muestra de médula ósea

En el caso de la MO, el objetivo del IF era la detección de EMR. Para ello, previo al marcaje, se realizó un proceso de lisis masiva (*bulk lysis*) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Cytognos, Salamanca, Spain). A continuación, se lavó dos veces con 2.5 mL de PBS cada vez y se incubaron en agitación durante otros 15 minutos con la combinación de AcMo que se muestra en la tabla 8. Cada tubo se lavó dos veces con PBS. Tras el último lavado se resuspendieron las células en 500 µl de PBS quedando la muestra preparada para su análisis en el citómetro. Se adquirieron 2x10<sup>6</sup> de células totales. Los volúmenes de AcMo utilizados se establecieron en base a los estudios previos de titulación de AcMo. Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en MO.

El análisis de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en MO se llevó a cabo mediante los softwares DIVA (Becton Dickinson, USA) e Infinicyt (Cytognos). En la figura 7 se muestra un ejemplo representativo de la estrategia de análisis para el estudio de la EMR mediante CMF en la MO de un paciente elegido aleatoriamente, utilizando el software DIVA.



**Figura 7:** Estrategia de análisis para el estudio de la enfermedad mínima residual en médula ósea.

#### 4.4 Citología y alteraciones genéticas en médula ósea

En la muestra de MO enviada al Servicio de Hematología del Hospital, se realizó una extensión y tinción con May Grünwald-Giemsa para su estudio citológico al microscopio óptico. Si el análisis detectaba >5% de CP, la muestra se enviaba al servicio de Citogenética para estudio genético mediante FISH (hibridación *in situ* de fluorescencia) de la delección del gen *P53* (del17p13), la del13q14, alteraciones en los genes *CDKN2C* (1p32) y *CKS1B* (1q21) y la presencia o ausencia del reordenamiento del gen *IgH*.

#### 4.5 Análisis de parámetros séricos

En el momento del análisis, se descongelaron a T<sup>a</sup> ambiente todos los sueros de los pacientes incluidos en el estudio y se determinaron los siguientes parámetros:

##### 4.5.1 Parámetros bioquímicos

La determinación en suero de creatinina, proteínas totales y albumina se realizó mediante un test colorimétrico en los sistemas Roche /Hitachi cobas c (Roche, Basilea, Suiza). En el mismo sistema Roche /Hitachi cobas c pero mediante inmunturbidimetría y fotometría, se determinaron los parámetros  $\beta$ -2-microglobulina y calcio, respectivamente.

#### 4.5.2 Inmunoglobulinas totales e isotipo de las inmunoglobulinas

La determinación de los niveles de los distintos isotipos de Igs en suero se realizó mediante nefelometría con el sistema automático IMAGE 800 de Inmunoquímica (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

#### 4.5.3 Proteinograma y cuantificación del componente monoclonal

El estudio del proteinograma se realizó por electroforesis capilar mediante el kit comercial “Hydragel Protein” con el sistema automatizado HYDRASYS 2 (Sebia, Evry, Francia). Si en algunas de las muestras se detectaba la presencia de un CM, se ampliaba un estudio de IFJ mediante el kit comercial Hydragel con el mismo sistema automatizado HYDRASYS 2 (Sebia, Evry, Francia).

#### 4.5.4 Cadenas ligeras libres

Las CLL (o FLC del inglés “Free light chains”) se cuantificaron mediante turbidimetría en el analizador SpaPlus con el kit *Freelite*® (The BindingSite, Birmingham, UK.) siguiendo las indicaciones del fabricante. El cCLL se calculó como cadena ligera libre  $\kappa$ /cadena ligera libre  $\lambda$  ( $\kappa/\lambda$ ) y se consideraron como valores normales de referencia aquellos entre 0.25-1.66.

#### 4.5.5 Cadenas pesadas ligeras

Las HLC en suero se cuantificaron mediante turbidimetría en el analizador SpaPlus con el kit *Hevylite*® (The BindingSite, Birmingham, U.K.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, a partir de los valores absolutos de IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , IgA $\kappa$  e IgA $\lambda$ , se calculó:

- El cHLC como IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$  o IgA $\kappa$ /IgA $\lambda$ . Los valores normales de referencia fueron 1.26-3.2 para la IgG y 0.58-2.52 para la IgA<sup>40</sup>.
- El rI/U como la cadena monoclonal involucrada en el numerador y la cadena policlonal no involucrada en el denominador (ej: IgG $\lambda$ /IgG $\kappa$  en un MM-IgG $\lambda$ )<sup>146</sup>.

#### 4.5.6 Cálculo del incremento relativo de inmunoglobulinas totales y cadenas pesadas ligeras

En el estudio de evaluación de las HLC como marcador precoz de recaída, y con el fin de representar la evolución del incremento relativo de los niveles de Ig totales, del rI/U y del cHLC se dividió, en un paciente en concreto, la primera determinación entre sí misma (valor= 1) y el resto de determinaciones entre el valor de la primera determinación. De esta manera se calcula el incremento relativo con respecto a la muestra basal y se representa el resultado en los diferentes momentos del tiempo usando el programa PRISM 5.0 de GraphPad (La Jolla, CA, USA).

## 5. Análisis estadístico

En el estudio comparativo de los grupos MM-LTCR, MM-SCR y LF-LTCR, se expresaron las variables cuantitativas como medidas de tendencia central (media) y desviación estándar (SD).

La evaluación de las diferencias entre los grupos estudiados se llevó a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis. También se realizó un estudio mediante el test *a posteriori* de Bonferroni para evaluar si existían diferencias en cada grupo con respecto al grupo control. La comparación de un paciente en el grupo MM-LTCR con ese mismo paciente en el grupo MM-LTCR al cabo de un año, se realizó mediante el test de Wilcoxon-matched. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si  $P \leq 0.05$  (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ). Los resultados estadísticos fueron analizados mediante el programa estadístico PRISM 5.0 de GraphPad (La Jolla, CA, USA).

En el estudio comparativo de las HLC se utilizó el test U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos y el test exacto de Fisher para el análisis de las variables categóricas. Los resultados estadísticos fueron analizados mediante el programa estadístico PRISM 5.0 de GraphPad (La Jolla, CA, USA).

## ***RESULTADOS***



## **1. Evaluación postrasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de la reconstitución inmunitaria en pacientes con mieloma múltiple, en pacientes con linfoma en remisión completa de larga evolución y en pacientes con mieloma múltiple en remisión completa corta.**

### **1.1 Características de los pacientes**

#### **1.1.1 Pacientes MM-LTCR**

El estudio del IF en SP se realizó en 20 pacientes con MM trasplantados (13 hombres y 7 mujeres) que se encontraban en RC de larga duración (MM-LTCR; >6 años) posTASPE. Los pacientes fueron reclutados aleatoriamente y en distintos momentos del tiempo tras el trasplante. La mediana de edad de los pacientes fue de 61 años (43-76 años) y la media de años en remisión posTASPE de 8 (6-19). Los subtipos de MM en este grupo fueron: 11 MM-IgGκ, 2 IgGλ, 3 IgAλ, 2 Bence Jones (BJ) κ y 2 BJ λ (tabla 9).

La respuesta previa al TASPE se evaluó siguiendo las indicaciones del grupo IMWG. Como tratamiento de inducción se utilizaron los esquemas de quimioterapia VAD (vincristina-doxorubicin-dexametasona) alternado con VBCMP/VBAD (vincristina-carmustine-melfalán-ciclofosfamida-prednisona/vincristina-carmustina-doxorubicina-dexametasona), salvo VD (bortezomib-dexametasona) en tres pacientes. Como terapia de acondicionamiento se utilizaron altas dosis de melfalán en 14 pacientes y busulfán más melfalán (BuMel) en 6 pacientes. Dos pacientes recibieron mantenimiento durante 2 años con dosis bajas de talidomida, y otros 4 pacientes durante menos de dos años y mensualmente con dosis bajas de dexametasona. El resto de los pacientes no recibieron tratamiento de mantenimiento. Las características de los pacientes y detalles de la terapia se resumen en la tabla 9.

Nº	Edad	Sexo	Tipo MM	Años posTASPE	Respuesta preTASPE	Citogenética	β-2M (mg/dL)	Estadio (DS/ISS)	Inducción	Acondicio- namiento
1	43	M	BJκ	6	MBRP	FISH neg: t(11;14), t(4;14), t(14;16)	Normal	IIB/2	VAD	Mel 200
2	61	F	BJλ	7	RP	Normal	Normal	IIA/1	VAD/ VBCMP	BuMel
3	64	F	IgGκ	8	RC	ND	Alta	IIA/3	VBCMP/ VBAD	Mel 140
4	71	M	IgGκ	11	MBRP	ND	Normal	IIIA/3	RT+ VBCMP/VBAD	Mel 200
5	61	M	IgGκ	13	MBRP	Trisomía 11	Alta	IIIA/3	RT+VAD	BuMel
6	51	M	IgGκ	6	MBRP	ND	Normal	IIA/2	TD	Mel 200
7	53	F	IgGκ	7	RC	ND	Normal	IIA/1	TVD	Mel 200
8	60	M	IgGκ	19	RC	ND	Normal	IIIB/1	VAD	BuMel
9	67	F	IgGκ	19	RP	ND	Normal	IIIA/1	VAD/ VCAD	BuMel
10	70	M	IgGκ	16	MBRP	ND	Alta	IIIA/3	RT/VAD	BuMel
11	60	F	BJλ	15	RC	Normal	Normal	IIIA/1	VAD	BuMel
12	59	M	IgAλ	8	RC	Normal. FISH neg	Normal	IIA/1	RT/VAD	Mel 200
13	64	F	IgGκ	8	RC	ND	Alta	IIA/2	VBCMP/VBAD	Mel 140
14	44	M	BJκ	6	RC	Hipodiploidia (30%). FISH neg.	Alta	IIIB/3	VD	Mel 200
15	76	F	IgAλ	6	RC	FISH neg.	Alta	IIA/2	VD	Mel 200
16	65	M	IgGκ	6	MBRP	Del(13q14.3)	Normal	IA/3	VD	Mel 200
17	64	F	IgGλ	9	MBRP	ND	Alta	IIIB/3	VAD	Mel 140
18	58	M	IgGκ	9	RP	ND	Normal	IIA/1	VBCMP/VBAD	Mel 200
19	67	M	IgAλ	8	RP	dup(11q)(5%); FISH neg	Normal	IIA/1	VBCMP/VBAD	Mel 200
20	49	M	IgGλ	9	MBRP	ND	ND	IIA	VBCMP/VBAD	Mel 200

**Tabla 9: Características de los pacientes MM-LTCR.**

MM: mieloma múltiple; M: masculino; F: femenino; MBRP: muy buena respuesta parcial; RP: respuesta parcial; RC: remisión completa; ND: no disponible; β-2M: beta-2-microglobulina; BJ: Bences Jones; DS/ISS: Durie-Salmon/Sistema Estadiaje Internacional; FISH: Hibridación *in situ* de fluorescencia; Del: delección; Dup: duplicación; Neg: negativo; VAD: vincristina-doxorubicina-dexametasona; VBCMP: vincristina-carmustina-melfalán-ciclofosfamida-prednisona; VBAD: vincristina-carmustina-doxorubicina-dexametasona; RT: radioterapia; TD: talidomida-dexametasona; TVD: talidomida-vincristina-dexametasona; VCAD: vincristina-ciclofosfamida-adriamicina-dexametasona; VD: Bortezomib-dexametasona; Mel: Melfalán; Bul: Busulfán. β-2M: Alta si >3.7mg/L; Normal si ≤1≤3,7mg/L.

### 1.1.2 Pacientes MM-SCR

Se analizaron también 8 pacientes con MM trasplantados (4 hombres y 4 mujeres) en RC de corta duración (<4 años) posTASPE. La mediana de edad de los pacientes estudiados fue de 60.5 años (57-74) y la mediana de años en remisión posTASPE de 2 (1-4). Los subtipos de MM incluidos en este grupo fueron: 3 IgGκ, 1 IgAκ, 2 IgAλ, 1 BJλ y 1 MM no secretor (tabla 10). En el momento del estudio, los pacientes presentaban también una RC inmunofenotípica.

La respuesta previa al TASPE se evaluó siguiendo las indicaciones del grupo IMWG. Como

tratamiento de inducción se utilizaron distintos ciclos de los esquemas de quimioterapia VD y PAD (bortezomib-doxorubicina-dexametasona). Salvo un paciente que recibió BuMel como terapia de acondicionamiento, todos los pacientes recibieron altas dosis de Mel. Tres pacientes se encontraban en tratamiento con interferón subcutáneo a bajas dosis y dos pacientes en tratamiento con ácido zoledrónico a bajas dosis para prevenir lesiones óseas. Un paciente se encontraba en tratamiento de mantenimiento con lenalidomida a dosis bajas; el resto de los pacientes no recibió tratamiento de mantenimiento. Las características de los pacientes y los detalles de la terapia se resumen en la tabla 10.

Nº	Edad	Sexo	Tipo de MM	Años pos TASPE	Respuesta preTASPE	β-2M (mg/dL)	Estadio (DS/ISS)	Tratamiento inducción	Acondicionamiento
1	68	M	MM NS	3	RC	Normal	IIIA/1	VD	Mel 200
2	66	F	IgAλ	2	RP	Normal	IIIA/1	VD	Mel 200
3	57	F	IgAλ	2	RC	Normal	IA/1	PAD	Mel 200
4	61	F	IgGκ	1,5	MBRP	Normal	IIIA/2	VD	Mel 200
5	58	F	IgGκ	2	MBRP	Normal	IIA/1	VD	Mel 200
6	58	M	IgAκ	1	RP	Normal	IA/2	VD	Mel 200
7	60	M	BJλ	2	ND	Alta	IIIA/3	VD	BuMel
8	74	M	IgGκ	4	MBRP	Normal	IIA/2	VD	Mel 320

**Tabla 10: Características de los pacientes MM-SCR.**

MM: mieloma múltiple; M: masculino; F: femenino; NS: no secretor; MBRP: muy buena respuesta parcial; RP: respuesta parcial; RC: remisión completa; ND: no disponible; β-2M: beta-2-microglobulina; BJ: Bences Jones; DS/ISS: Durie-Salmon/Sistema Estadiaje Internacional; VD: bortezomib-dexametasona; V: Bortezomib; PAD: Bortezomib-doxorubicina-dexametasona. Mel: Mel-falán; Bu: Busulfan. β-2M: Alta si  $>3.7\text{mg/L}$ ; Normal si  $\geq 1 \leq 3,7\text{mg/L}$ .

### 1.1.3 Pacientes LF-LTCR

El estudio del IF se realizó también en un grupo de 10 pacientes trasplantados por linfoma (5 mujeres y 5 hombres) en RC de al menos 6 años de duración postTASPE (LF-LTCR;  $>6$  años). La mediana de edad de los pacientes fue de 58 años (42-76). De los 10 pacientes analizados, 4 fueron diagnosticados de linfoma de Hodgkin, 5 de linfoma no Hodgkin de célula grande B y 1 no Hodgkin anaplásico de célula T.

## 1.2 Enfermedad mínima residual en médula ósea en los pacientes MM-LTCR mediante citometría de flujo multiparamétrica

En los pacientes MM-LTCR se realizó un estudio de EMR por CMF de ocho colores en MO, que confirmó la ausencia de EMR en todos ellos salvo en un paciente que presentaba un 0.12% de CPM. Se consideró que las CP eran normales cuando presentaban mayoritariamente el fenotipo  $\text{CD138}^+\text{CD38}^{+++}\text{CD19}^+\text{CD27}^{+++}\text{CD45}^{+/débil}\text{CD56}^-\text{CD81}^+\text{CD20}^-\text{CD28}^-\text{CD117}^-$ . En la tabla 11 se especifican los resultados de las pruebas realizadas para confirmar el resultado de RC que incluyeron el estudio del proteinograma, la IFJ en suero y orina, los valores séricos del

cCLL y de iRC en los pacientes MM-LTCR (tabla 11).

Nº	Tipo de MM	EEF	IFJ suero/orina	cCLL (0,25-1,66)	CMF: %CP en MO	IF de CP**
1	BJκ	Normal	Policlonal/Negativo	1,02	0,10%	Normal
2	BJλ	Normal	Policlonal/Negativo	0,61	0,40%	Normal
3	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	0,97	ND	ND
4	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	0,65	1,30%	Normal
5	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	1,15	0,80%	Normal
6	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	0,53	0,30%	Normal
7	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	1,13	0,30%	Normal
8	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	0,81	0,60%	Normal
9	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	0,72	0,80%	Normal
10	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	0,83	0,50%	Normal
11	BJλ	Normal	Policlonal/Negativo	0,88	0,10%	Normal
12	IgAλ	Normal	Policlonal/Negativo	0,48	ND	ND
13	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	0,97	0,25%	Normal
14	BJκ	Normal	Policlonal/Negativo	ND	0,25%	Normal
15	IgAλ	Normal	Policlonal/Negativo	ND	ND	ND
16	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	ND	ND	ND
17	IgGλ	Aumento policlonal	Hipergamma/Policlonal	1,75	0,40%	Normal
18	IgGκ	Normal	Policlonal/Negativo	1,58	0,60%	Normal
19*	IgAλ	Hipogamma	CMAλ/Trazas λlibre	1,21	0,30%	40% patológico
20*	IgGλ	CM	CMGλ/Policlonal	1,08	ND	ND

**Tabla 11 Estudio de enfermedad mínima residual en médula ósea en los pacientes MM-LTCR analizados.** MM: mieloma múltiple; EEF: electroforesis de proteínas del suero; IFJ: inmunofijación; cCLL: cociente cadenas ligeras libres; CP: células plasmáticas; MO: médula ósea; CMF: citometría de flujo multiparamétrica; IF: inmunofenotipo; BJ: Bences Jones; ND: no disponible; Hipogamma: hipogammaglobulinemia; Hipergamma: hipergammaglobulinemia; IF de CP\*\*: normal si mayoritariamente CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+++</sup>CD45<sup>+débil</sup>CD56<sup>-</sup>CD81<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD117<sup>-</sup>; \*: pacientes en muy buena respuesta parcial (19\*) o en respuesta parcial (20\*).

Adicionalmente, se cuantificaron los niveles totales de Igs y de HLC en los pacientes MM-LTCR (tabla 12). Como se observa, en todos los pacientes MM-LTCR IgGκ el valor del cHLC es cercano o incluso inferior al límite inferior de la normalidad, mientras que en los pacientes IgGλ los valores están cercanos al límite superior (tabla 12).

Nº	Isotipo MM	IgG (800-1600 mg/dL)	IgA (100-300 mg/dL)	IgM (80-250 mg/dL)	IgGκ (434-1218 mg/dL)	IgGλ (237-591 mg/dL)	IgAκ (43-236 mg/dL)	IgAλ (40-173 mg/dL)	cHLC (IgGκ/IgGλ) (1.26-3.2)	cHLC (IgAκ/IgAλ) (0.58-2.52)
1	BJκ	783	64,3	52,1	NA	NA				
2	BJλ	1080	185	58,7	NA	NA				
3	IgGκ	1760	281	240	880,6	797,1			1,10	
4	IgGκ	1090	404	173	392,5	317,5			1,24	
5	IgGκ	734	337	91,4	269	239,5			1,12	
6	IgGκ	980	158	64,6	396,8	236,3			1,68	
7	IgGκ	575	270	96,5	196,5	154,2			1,27	
8	IgGκ	1820	245	129	707,5	654,3			1,08	
9	IgGκ	1370	426	84,1	582,3	431,3			1,35	
10	IgGκ	1490	400	82	710,1	581,5			1,22	
11	BJλ	1230	223	80,1	NA	NA				
12	IgAλ	940	222	112			103,7	78,5		1,32
13	IgGκ	1650	270	203	511,3	356,7			1,43	
14	BJκ	665	74	144	NA	NA				
15	IgAλ	986	129	89			ND	ND		ND
16	IgGκ	746	114	106	ND	ND			ND	
17	IgGλ	2320	81,3	102	1637,7	450,8			3,63	
18	IgGκ	1490	179	105	527,2	417			1,26	
19	IgAλ	635	331	53			154,4	107		1,44
20	IgGλ	1100	60,9	57	ND	ND			ND	

**Tabla 12:** Niveles de inmunoglobulinas en suero, cadenas pesadas ligeras y el cociente cadenas pesadas ligeras en los pacientes MM-LTCR. MM: mieloma múltiple; Ig: inmunoglobulina; BJ: Bences Jones; NA: No aplicable; ND: no disponible; Ig: inmunoglobulina; cHLC: cociente cadenas pesadas ligeras

### 1.3 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en los pacientes MM-LTCR

Se compararon la proporción y los valores absolutos de las distintas subpoblaciones de LT en la SP de los pacientes MM-LTCR frente a controles sanos de edades parecidas. Los resultados se confirmaron al cabo de un año en una segunda muestra de los mismos pacientes MM-LTCR (grupo MM-LTCR +1).

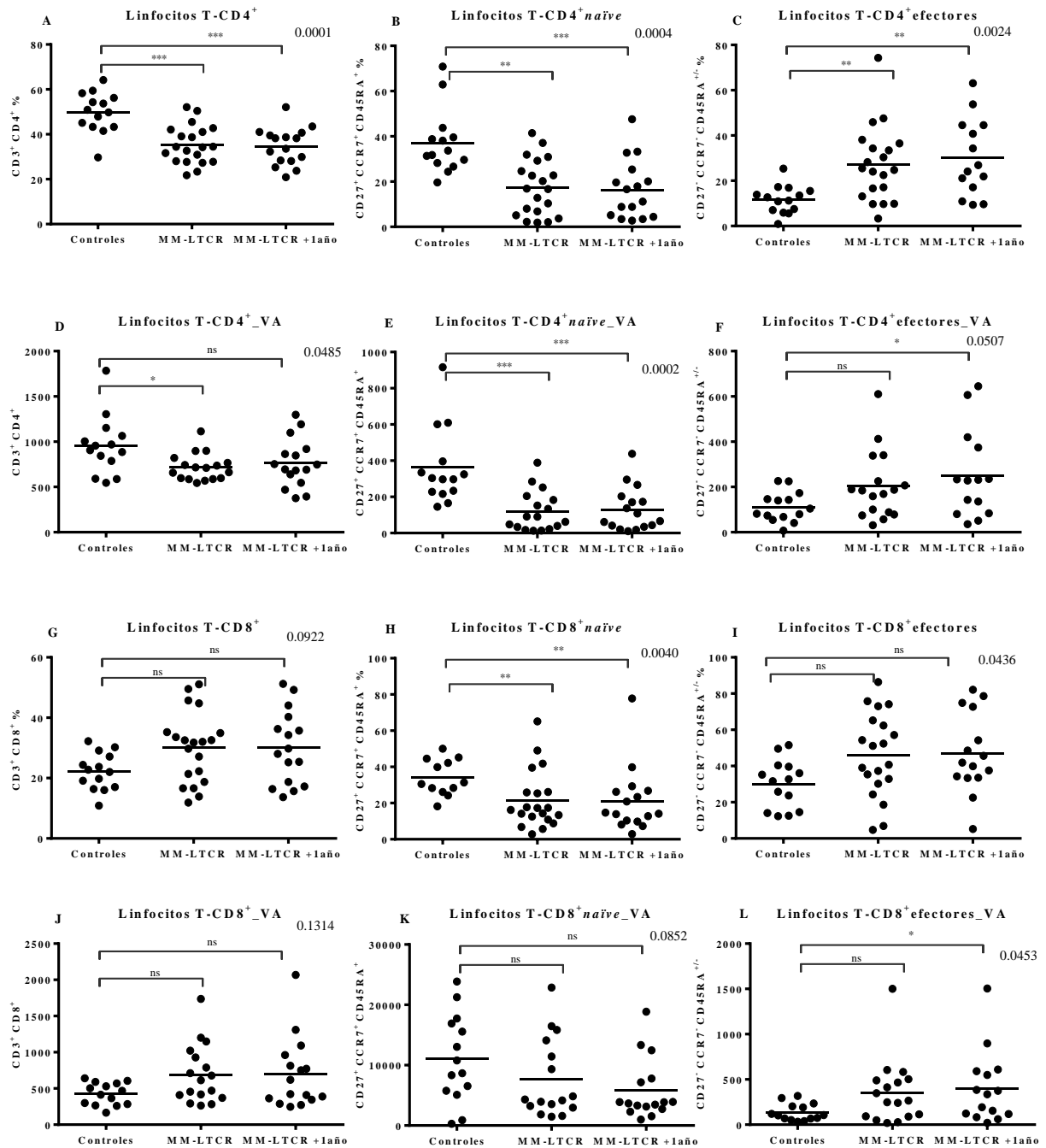
#### 1.3.1. Caracterización de linfocitos T

*Los pacientes MM-LTCR presentan una menor proporción de linfocitos T naïve y un aumento del porcentaje de linfocitos T efectores en sangre periférica*

Como se observa en la figura 8, los pacientes MM-LTCR presentaron un porcentaje menor de LT-CD4<sup>+</sup> totales ( $p=0.0001$ ; figura 8A) junto a un menor número de LT-CD4<sup>+</sup> naïve ( $p=0.0004$ ; figura 8B) y un aumento de LT-CD4<sup>+</sup> memoria efectores ( $p=0.0024$ ; figura 8C). También se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el valor absoluto de los LT-CD4<sup>+</sup> y T-CD4<sup>+</sup> naïve ( $p=0.0485$ ,  $p=0.0002$ ; figura 8D y 8E), observándose una tendencia al aumento de los LT-CD4<sup>+</sup> memoria efectores que no llegó a ser estadísticamente significativa ( $p=0.0507$ ; figura 8F).

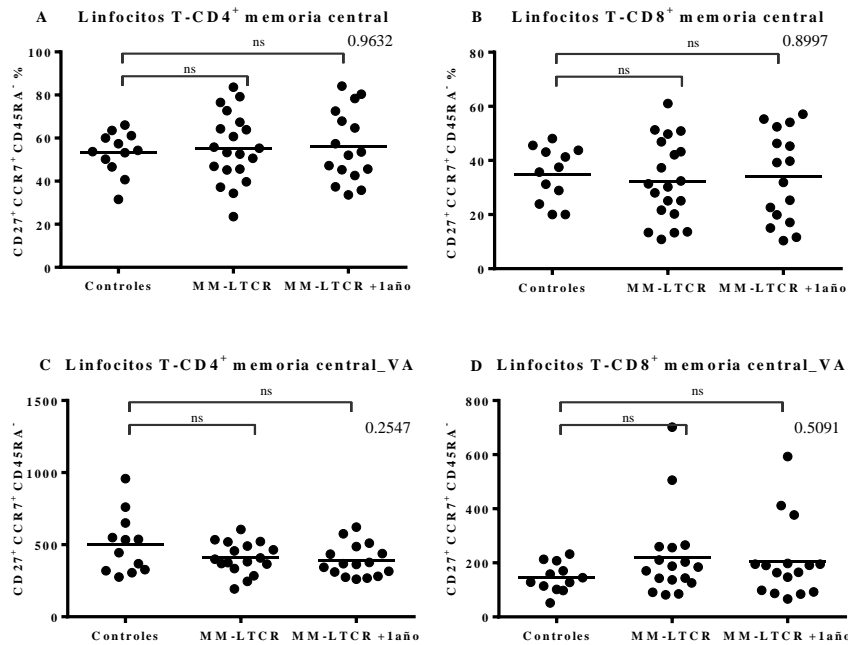
Resultados similares se obtuvieron en el estudio de los LT-CD8<sup>+</sup> en SP. Aunque sin diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de LT-CD8<sup>+</sup> totales (figura 8G), se observó un descenso significativo del porcentaje de LT-CD8<sup>+</sup> naïve ( $p=0.0040$ ; figura 8H) y un aumento del porcentaje de los LT-CD8<sup>+</sup> memoria efectores ( $p=0.0436$ ; figura 8I) con respecto a los controles sanos. Con respecto a los valores absolutos, sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el valor absoluto de los LT-CD8<sup>+</sup> memoria efectores ( $p=0.0453$ , figura 8L). Este aumento de los LT-memoria efectores, tanto en porcentajes como en valores absolutos y aunque no siempre estadísticamente significativo, se debe a un aumento de los memoria efectores CD45RA<sup>+</sup> (CD27<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) y CD45RA<sup>-</sup> (CD27<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>), tanto en los LT-CD4<sup>+</sup> como en los LT-CD8<sup>+</sup> (datos no mostrados).

Esta caracterización se repitió en el mismo grupo de pacientes con MM en LTCR al cabo de un año (grupo MM-LTCR +1 año), confirmando que se trata de un perfil inmunitario de LT-CD4<sup>+</sup> y LT-CD8<sup>+</sup> estable en el tiempo (figura 8A-8L).



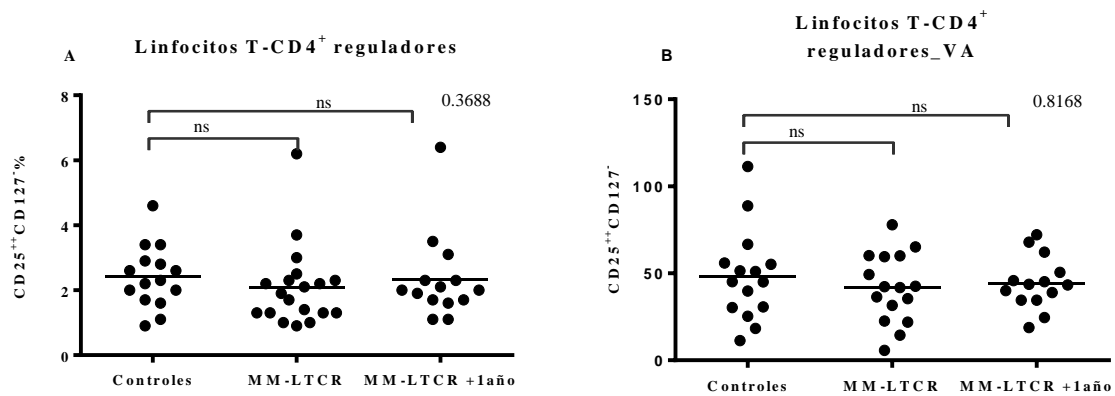
**Figura 8:** Distribución de las subpoblaciones de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> y linfocitos T-CD8<sup>+</sup> en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-LTCR al cabo de un año y de los controles sanos de edades parecidas. Se muestra (A) Proporción de linfocitos T (LT)-CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) sobre linfocitos totales, y la proporción en los LT-CD4<sup>+</sup> de (B) LT-CD4<sup>+</sup> naïve (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), (C) LT-CD4<sup>+</sup> de memoria efectores (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+/+</sup>) y el valor absoluto (VA) de (D) LT-CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), (E) LT-CD4<sup>+</sup> naïve y (F) LT-CD4<sup>+</sup> de memoria efectores. Con respecto a los LT-CD8<sup>+</sup> se muestra (G) proporción de LT-CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) sobre linfocitos totales, y la proporción en los LT-CD8<sup>+</sup> de (H) LT-CD8<sup>+</sup> naïve (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), (I) LT-CD8<sup>+</sup> de memoria efectores (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+/+</sup>) y el valor absoluto (VA) de (J) LT-CD8<sup>+</sup>, (K) LT-CD8<sup>+</sup> naïve y (L) LT-CD8<sup>+</sup> de memoria efectores. Los resultados se confirman al cabo de un año en el grupo MM-LTCR +1año. El valor numérico en el cuadrante superior derecho de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Kruskal-Wallis. El análisis entre grupos se realizó mediante el test *a posteriori* de Bonferroni indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

Por su parte, no se observaron diferencias significativas en las subpoblaciones de LT-CD4<sup>+</sup> ni T-CD8<sup>+</sup> de memoria central (figura 9) ni en el porcentaje ni en los valores absolutos de los LT-CD4<sup>+</sup> reguladores (figura 10).



**Figura 9:** Distribución de los linfocitos T de memoria central en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-LTCR al cabo de un año y de los controles sanos de edades parecidas. Se muestra la proporción de (A) linfocitos T (LT)-CD4<sup>+</sup> de memoria central (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) en los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> totales, (B) LT-CD8<sup>+</sup> de memoria central (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) en los LT-CD8<sup>+</sup> totales y el valor absoluto (VA) de (C) LT-CD4<sup>+</sup> de memoria central y (D) LT-CD8<sup>+</sup> de memoria central. Los resultados se confirman al cabo de un año en el grupo MM-LTCR + 1 año. El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Kruskal-Wallis. El análisis entre grupos se realizó mediante el test *a posteriori* de Bonferroni indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.





**Figura 10:** Distribución de la subpoblación de linfocitos T reguladores en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-LTCR al cabo de un año y de los controles sanos de edades parecidas. Se muestra (A) la proporción de linfocitos T reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) y (B) sus valores absolutos. Los resultados se confirman al cabo de un año en el grupo MM-LTCR +1año. El valor numérico en el cuadrante superior derecho de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Kruskal-Wallis. El análisis entre grupos se realizó mediante el *test a posteriori* de Bonferroni indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

### 1.3.2. Caracterización de linfocitos B

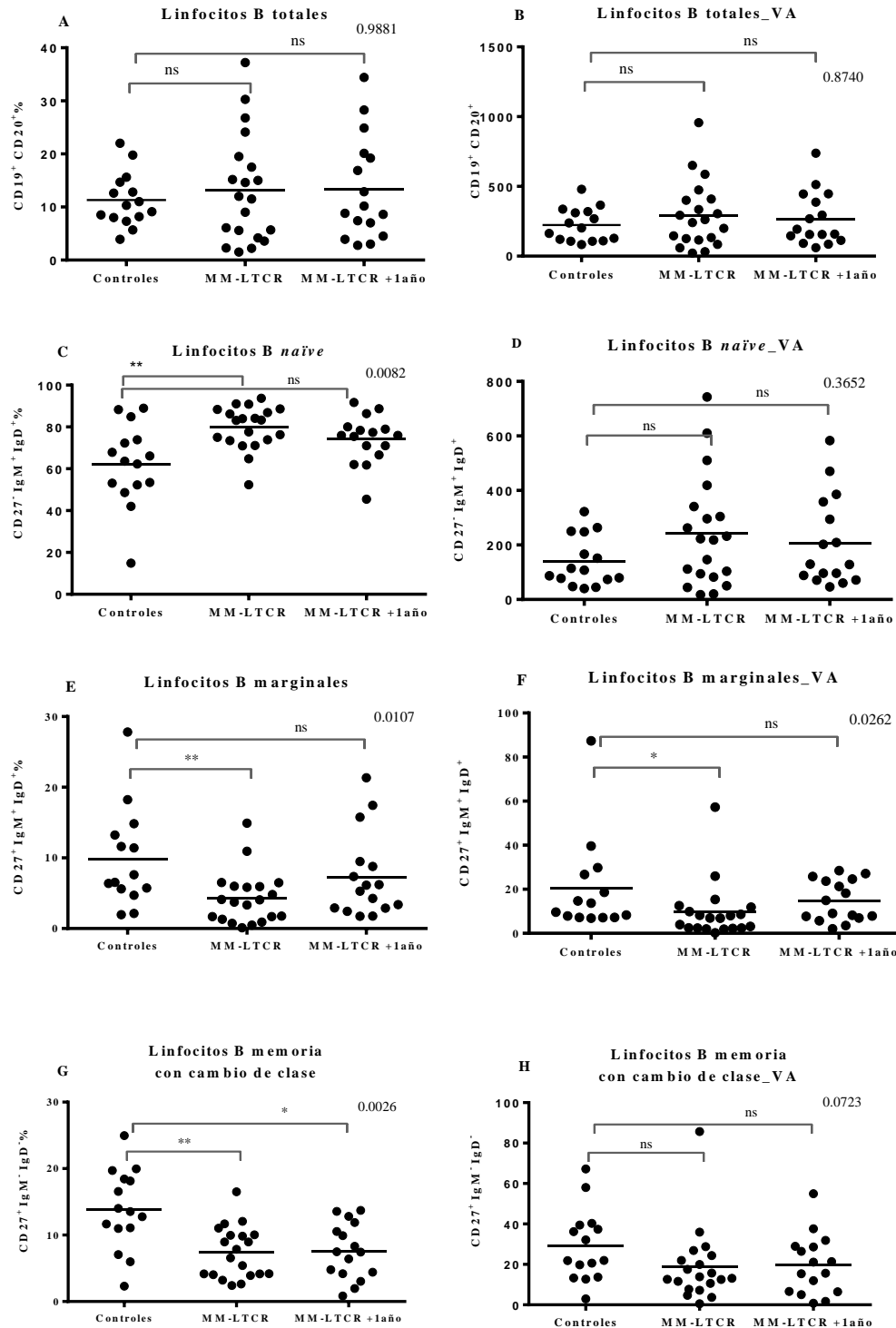
*Los pacientes MM-LTCR presentan una mayor proporción de linfocitos B naïve y un descenso de los linfocitos B marginales y de los linfocitos B memoria con cambio de clase en sangre periférica.*

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de LB totales (figura 11A), el porcentaje de LB-naïve resultó ser significativamente mayor en los pacientes MM-LTCR que en los controles sanos ( $p=0.0082$ ; figura 11B). Asimismo, se observa una reducción significativa de los LB marginales ( $p=0.0107$ ; figura 11E) y de los LB memoria con cambio de clase ( $p=0.0026$ ; figura 11G).

Sólo los valores absolutos de los LB de la zona marginal resultaron también estadísticamente significativos ( $p=0.0262$ ; figura 11F). Los valores absolutos del resto de subpoblaciones de LB mostraron la misma tendencia que los valores relativos pero sin llegar a alcanzar significación estadística (figura 11D y 11H).

Los mismos resultados se confirmaron al cabo de un año en los pacientes con MM en LTRC (grupo MM-LTCR +1 año).

No se encontraron diferencias en los LB transicionales ( $CD27^-CD10^+CD38^+$ ) ni en la subpoblación de los plasmablastos en SP ( $CD19^+CD20^-CD27^{++}CD38^{++}$ ) (datos no mostrados).



**Figura 11:** Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-LTCR al cabo de un año y de los controles sanos de edades parecidas. Se muestra la proporción de (A) linfocitos B (LB) ( $CD19^+CD20^+$ ) sobre los linfocitos totales y la proporción en LB totales de (C) LB-naïve ( $CD27^-IgD^+IgM^+$ ), (E) LB marginales ( $CD27^+IgD^+IgM^+$ ) y (G) LB memoria con cambio de clase ( $CD27^+IgD^+IgM^-$ ). También se muestran los valores absolutos (VA) de (B) LB, (D) LB-naïve, (F) LB marginales y (H) LB memoria con cambio de clase. Los resultados se confirman al cabo de un año en los MM-LTCR + 1 año. El valor numérico en el cuadrante superior derecho de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Kruskal-Wallis. El análisis entre grupos se realizó mediante el test *a posteriori* de Bonferroni indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

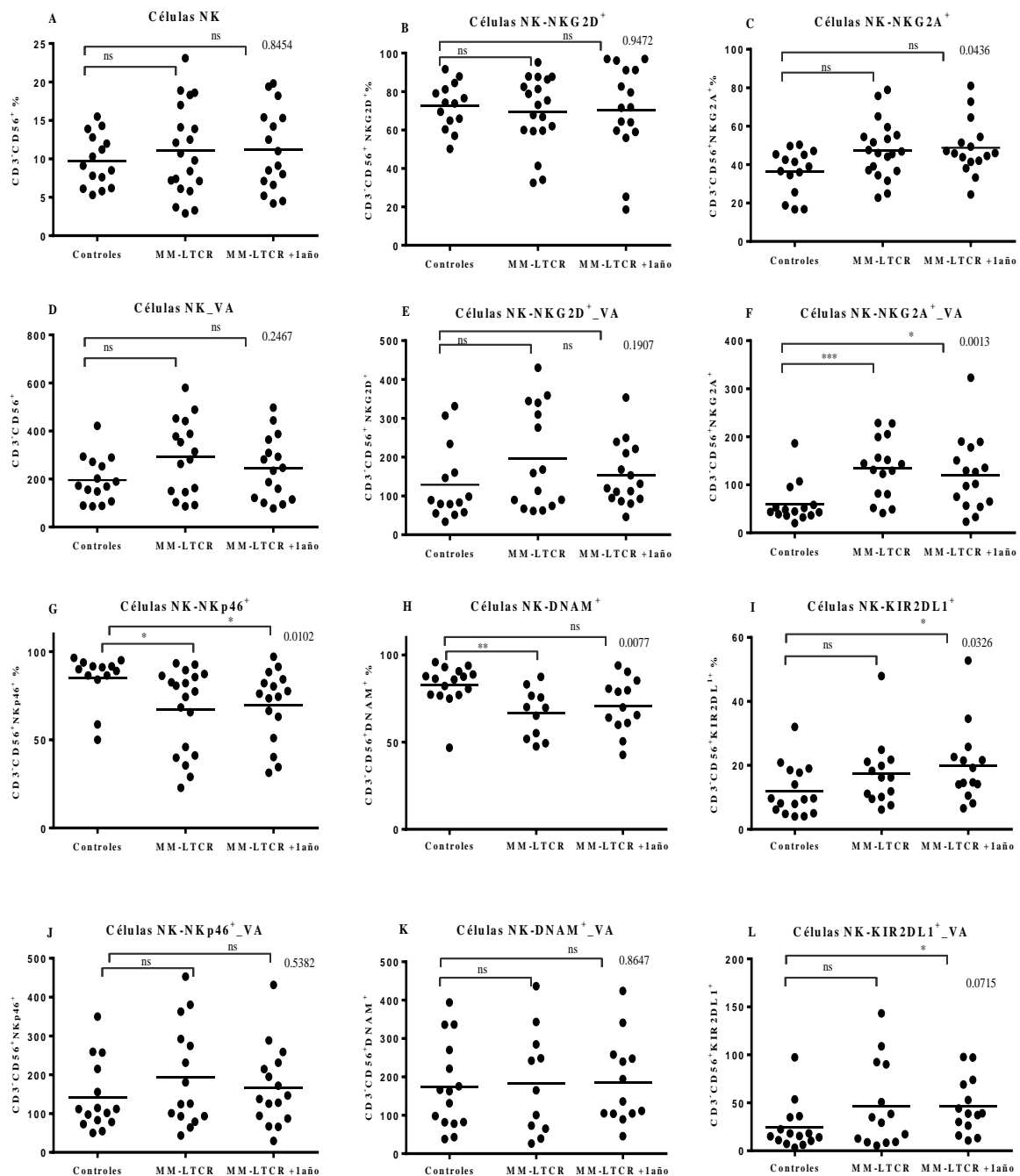
### 1.3.3. Caracterización de células NK

*Los pacientes MM-LTCR tiene una distribución característica de algunos de los receptores de membrana de las células NK.*

Los pacientes MM-LTCR tienen el mismo porcentaje y el mismo valor absoluto de células NK que los controles sanos (figura 12A). En cuanto a los receptores activadores e inhibidores no se observaron diferencias en la distribución de los receptores activadores NKG2C (datos no mostrados) ni NKG2D (figura 12B). Sin embargo, se observó un aumento en la expresión de la molécula inhibidora NKG2A en los pacientes MM-LTCR con respecto a los controles, tanto en porcentaje ( $p=0.0436$ , figura 12C) como en valor absoluto ( $p=0.0013$ , figura 12F). Los resultados se confirmaron al cabo de un año en el grupo de pacientes MM-LTCR +1 año.

Por otra parte, en los pacientes MM-LTCR se observó una disminución significativa de la expresión de los receptores NKp46 y DNAM (figura 12G y 12H;  $p=0.0102$  y  $p=0.0077$ ) y un aumento significativo de la expresión del receptor de inhibición KIR2DL1 (figura 12I;  $p=0.0326$ ). Ninguno de los valores absolutos de las células que expresan estos receptores alcanzó significación estadística en los pacientes (figura 12D-F y 12J-L). Los resultados se confirmaron al cabo de un año en los pacientes MM-LTCR +1 año.

Con respecto a los LT-CD8<sup>+</sup>, y aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo entre los grupos, se aprecia una disminución de la expresión de NKG2D con respecto a los controles sanos. No se encontraron diferencias en la expresión de NKG2C, NKG2A ni DNAM en esta misma subpoblación de LT-CD8<sup>+</sup>. Los resultados se confirmaron al cabo de un año en los pacientes MM-LTCR +1 año (datos no mostrados).



**Figura 12:** Expresión de los receptores activadores e inhibidores de las células NK en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-LTCR al cabo de un año y de los controles sanos de edades parecidas. Se muestra la proporción de (A) células NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) sobre los linfocitos totales y la proporción de células NK que expresan (B) NKG2D<sup>+</sup> y (C) NKG2A<sup>+</sup>, y los valores absolutos (VA) de (D) células NK, (E) células NK-NKG2D<sup>+</sup> y (F) células NK-NKG2A<sup>+</sup>. Asimismo, se muestra la proporción de células NK que expresan (G) NKp46<sup>+</sup>, (H) DNAM<sup>+</sup> y (I) KIR2DL1<sup>+</sup> y los VA de (J) células NK-NKp46<sup>+</sup>, (K) células NK-DNAM<sup>+</sup> y (G) células NK KIR2DL1<sup>+</sup>. Los resultados se confirman al cabo de un año en los MM-LTCR + 1 año. El valor numérico en el cuadrante superior derecho de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Kruskal-Wallis. El análisis entre grupos se realizó mediante el test *a posteriori* de Bonferroni indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada..

#### **1.4 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de los pacientes MM-SCR**

Con el fin de determinar en qué momento aparece el patrón inmunitario observado en los pacientes MM-LTCR, se llevó a cabo el mismo estudio en pacientes con MM en RC corta (<5 años) posTASPE.

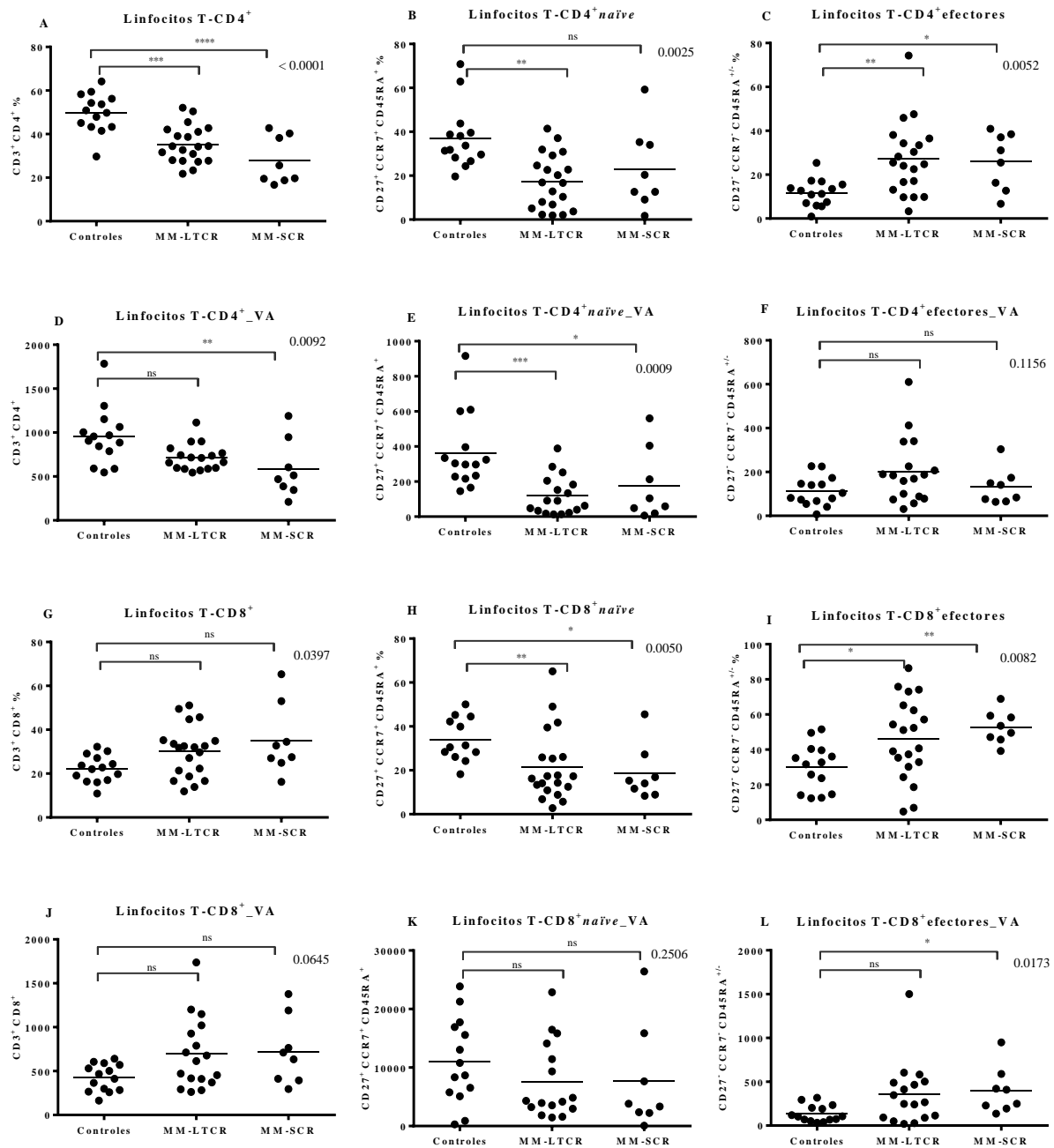
##### **1.4.1. Caracterización de linfocitos T**

*Los pacientes MM-SCR presentan un fenotipo de linfocitos T muy similar a los MM-LTCR caracterizado por un menor número de LT naïve junto a un aumento de los LT efectores.*

Tal y como ocurría en los pacientes MM-LTCR, en los pacientes MM-SCR también se observó un descenso significativo e incluso más pronunciado del porcentaje y del valor absoluto de los LT-CD4<sup>+</sup> totales con respecto a los controles sanos ( $p < 0.0001$ ; figura 13A; y  $p = 0.0092$ ; figura 13D). También presentaron un menor número de LT-CD4<sup>+</sup> naïve ( $p = 0.0025$ ; figura 13B;) y LT-CD8<sup>+</sup> naïve ( $p = 0.0050$ ; figura 13H;), y un aumento de los LT-CD4<sup>+</sup> y LT-CD8<sup>+</sup> de memoria efectores ( $p = 0.0052$ ; figura 13C; y  $p = 0.0082$ ; figura 13I, respectivamente). Las mismas tendencias en valores absolutos se observaron para las distintas subpoblaciones linfocitarias analizadas (figura 13D-F y 13J-L).

En los pacientes MM-SCR, el aumento de los LT-CD4<sup>+</sup> memoria efectores se produce principalmente a expensas de los CD45RA<sup>-</sup>, y en los LT-CD8<sup>+</sup> memoria efectores el aumento de los CD45RA<sup>-</sup> es más significativo que el de los CD45RA<sup>+</sup>, tanto en porcentajes como en valores absolutos (datos no mostrados).

Tampoco se observan diferencias en el porcentaje de LT-CD4<sup>+</sup> ni T-CD8<sup>+</sup> de memoria central (datos no mostrados)



**Figura 13:** Distribución de las subpoblaciones de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> y linfocitos T-CD8<sup>+</sup> en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-SCR y de los controles sanos de edades parecidas. Se muestra (A) Proporción de linfocitos T (LT)-CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) sobre linfocitos totales, y la proporción en los LT-CD4<sup>+</sup> de (B) LT-CD4<sup>+</sup> naïve (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), (C) LT-CD4<sup>+</sup> de memoria efectores (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) y el valor absoluto (VA) de (D) LT-CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), (E) LT-CD4<sup>+</sup> naïve y (F) LT-CD4<sup>+</sup> de memoria efectores. Con respecto a los LT-CD8<sup>+</sup> se muestra (G) proporción de LT-CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) sobre linfocitos totales, y la proporción en los LT-CD8<sup>+</sup> de (H) LT-CD8<sup>+</sup> naïve (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), (I) LT-CD8<sup>+</sup> de memoria efectores (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) y VA de (J) LT-CD8<sup>+</sup>, (K) LT-CD8<sup>+</sup> naïve y (L) LT-CD8<sup>+</sup> de memoria efectores. El valor numérico en el cuadrante superior derecho de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Kruskal-Wallis. El análisis entre grupos se realizó mediante el test *a posteriori* de Bonferroni indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

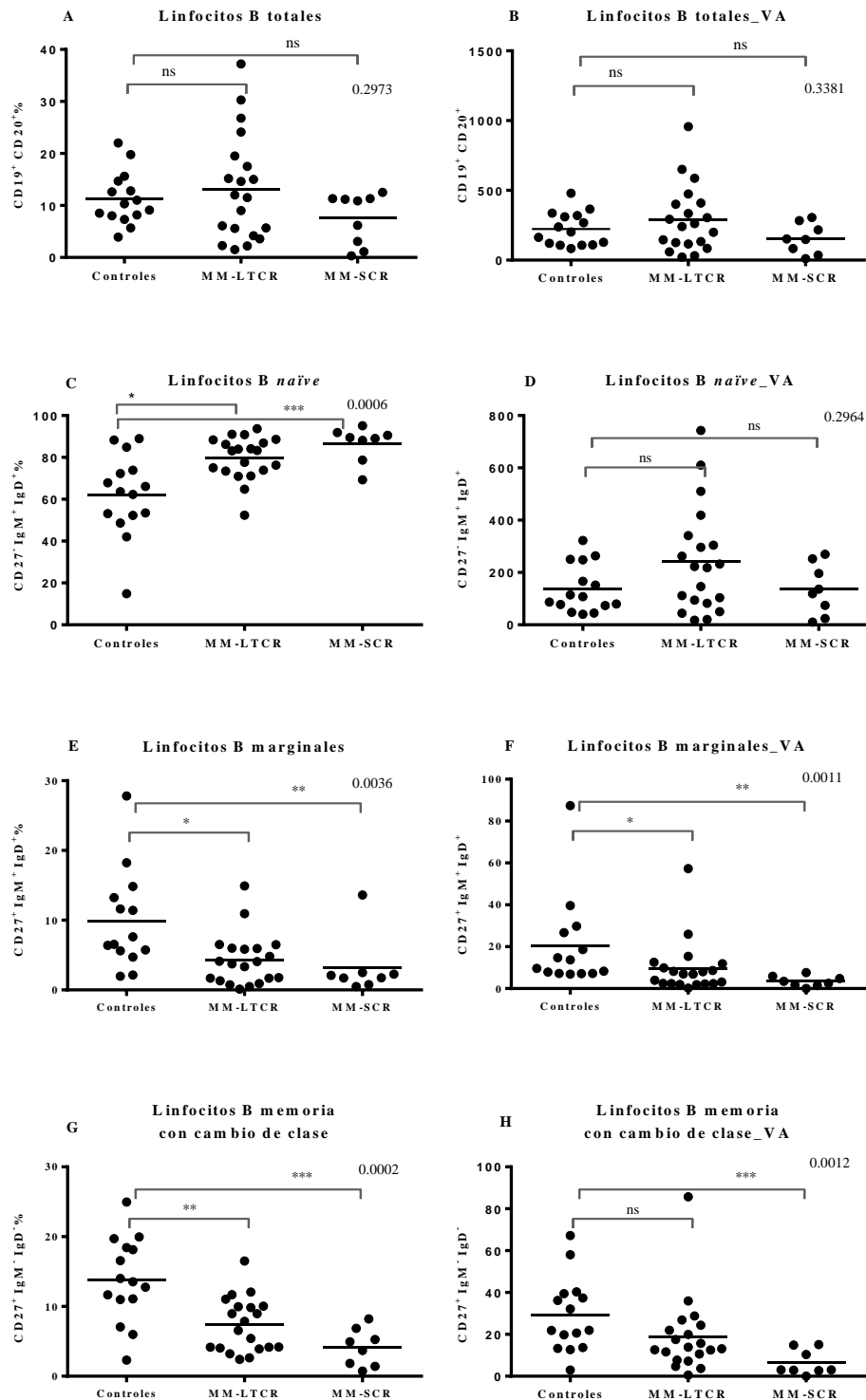
#### 1.4.2. Caracterización de linfocitos B

*Los pacientes MM-SCR también presentan una mayor proporción de células B naïve y un descenso de las células B marginales y células B memoria con cambio de clase en sangre periférica.*

A pesar de no encontrar diferencias significativas en el porcentaje ni en el número de LB totales (figura 14A y 14B), el porcentaje de LB naïve resultó ser significativamente mayor en los pacientes en MM-SCR que en los controles sanos ( $p=0.0006$ ; figura 14C). Se observó también una reducción significativa de la proporción y valores absolutos de los LB marginales ( $p=0.0036$ , figura 14E y  $p=0.0011$ , figura 14F) y de los LB memoria con cambio de clase ( $p=0.0002$ , figura 14G y  $p=0.0012$ , figura 14H). En general, para estas subpoblaciones de LB, las diferencias son más acusadas en los MM-SCR que en MM-LTCR con respecto a los controles, tanto en valores absolutos como en porcentajes (figura 14).

No se encontraron diferencias en los LB transicionales ( $CD27^-CD10^+CD38^+$ ) ni en la subpoblación de los plasmablastos en SP ( $CD19^+CD20^-CD27^{++}CD38^{++}$ ) (datos no mostrados).





**Figura 14:** Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes MM-SCR y de los controles sanos de edades parecidas. Se muestra la proporción de (A) linfocitos B (LB) (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>) sobre los linfocitos totales y la proporción en LB totales de (C) LB naïve (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), (E) LB marginales (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) y (G) LB memoria con cambio de clase (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>). También se muestran los valores absolutos (VA) de (B) LB, (D) LB naïve, (F) LB marginales y (H) LB memoria con cambio de clase. El valor numérico en el cuadrante superior derecho de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Kruskal-Wallis. El análisis entre grupos se realizó mediante el test *a posteriori* de Bonferroni indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

### **1.5 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en los pacientes LF-LTCR**

Con el fin de determinar si el IF de los pacientes MM-LTCR es específico o no del MM, se llevó a cabo el mismo estudio en pacientes con linfoma en RC de larga duración post-TASPE (LF-LTCR)

#### **1.5.1. Caracterización de linfocitos T**

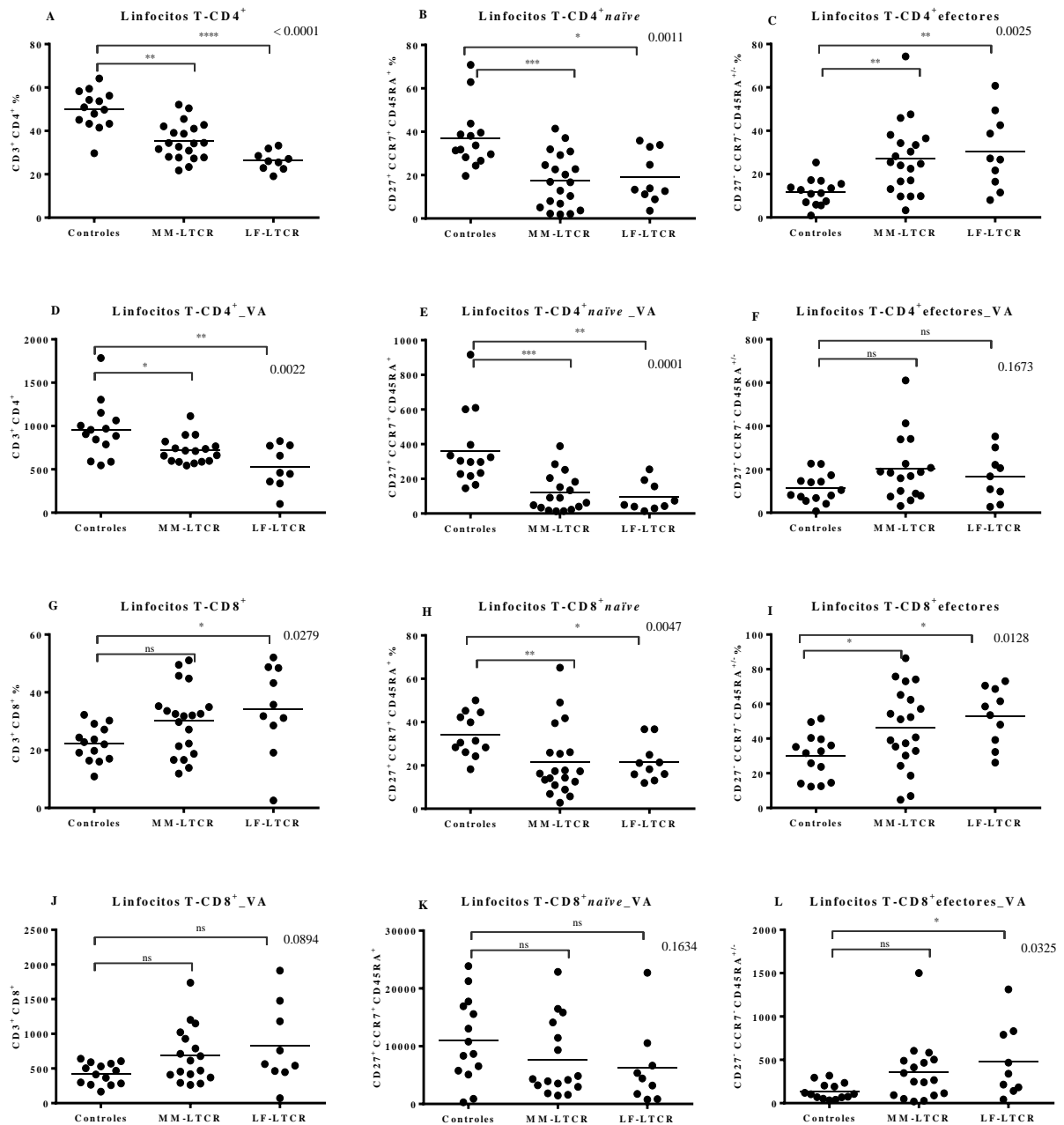
*Los pacientes LF-LTCR presentan una menor proporción de células T naïve junto a una mayor proporción de células T efectoras en sangre periférica.*

Como se observa en la figura 15, tanto los pacientes MM-LTCR como los LF-LTCR presentaron menor número y menor porcentaje de LT-CD4<sup>+</sup> ( $p < 0.0001$ ; figura 15A), una disminución de los LT-CD4<sup>+</sup> naïve tanto del valor relativo ( $p = 0.0011$ ; figura 15B) como del valor absoluto ( $p = 0.0001$ ; figura 15E) y un aumento de la proporción de los LT-CD4<sup>+</sup> memoria efectoras CD45RA<sup>+</sup> ( $p = 0.0025$ ; figura 15C).

Con respecto a los LT-CD8<sup>+</sup> se observa un aumento en el porcentaje de LT-CD8<sup>+</sup> ( $p = 0.0279$ ; figura 15G) y como ocurre en los LT-CD4<sup>+</sup>, una menor proporción de los LT-CD8<sup>+</sup> naïve ( $p = 0.0047$ ; figura 15H) y un importante incremento del porcentaje y de los valores absolutos de células CD8<sup>+</sup> memoria efectoras ( $p = 0.0128$ , figura 15I y  $p = 0.0325$ , figura 15L) con respecto a los controles sanos.

Como ocurría en los MM-LTCR, el aumento de LT-CD4<sup>+</sup> memoria efectoras y LT-CD8<sup>+</sup> memoria efectoras se produjo también a expensas de los CD45RA<sup>-</sup> y CD45RA<sup>+</sup>, si bien sólo en los memoria efectoras CD45RA<sup>+</sup> se consiguieron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).

Al igual que en los pacientes MM-LTCR no se observaron diferencias significativas en los LT-CD4<sup>+</sup> ni T-CD8<sup>+</sup> memoria central (datos no mostrados).



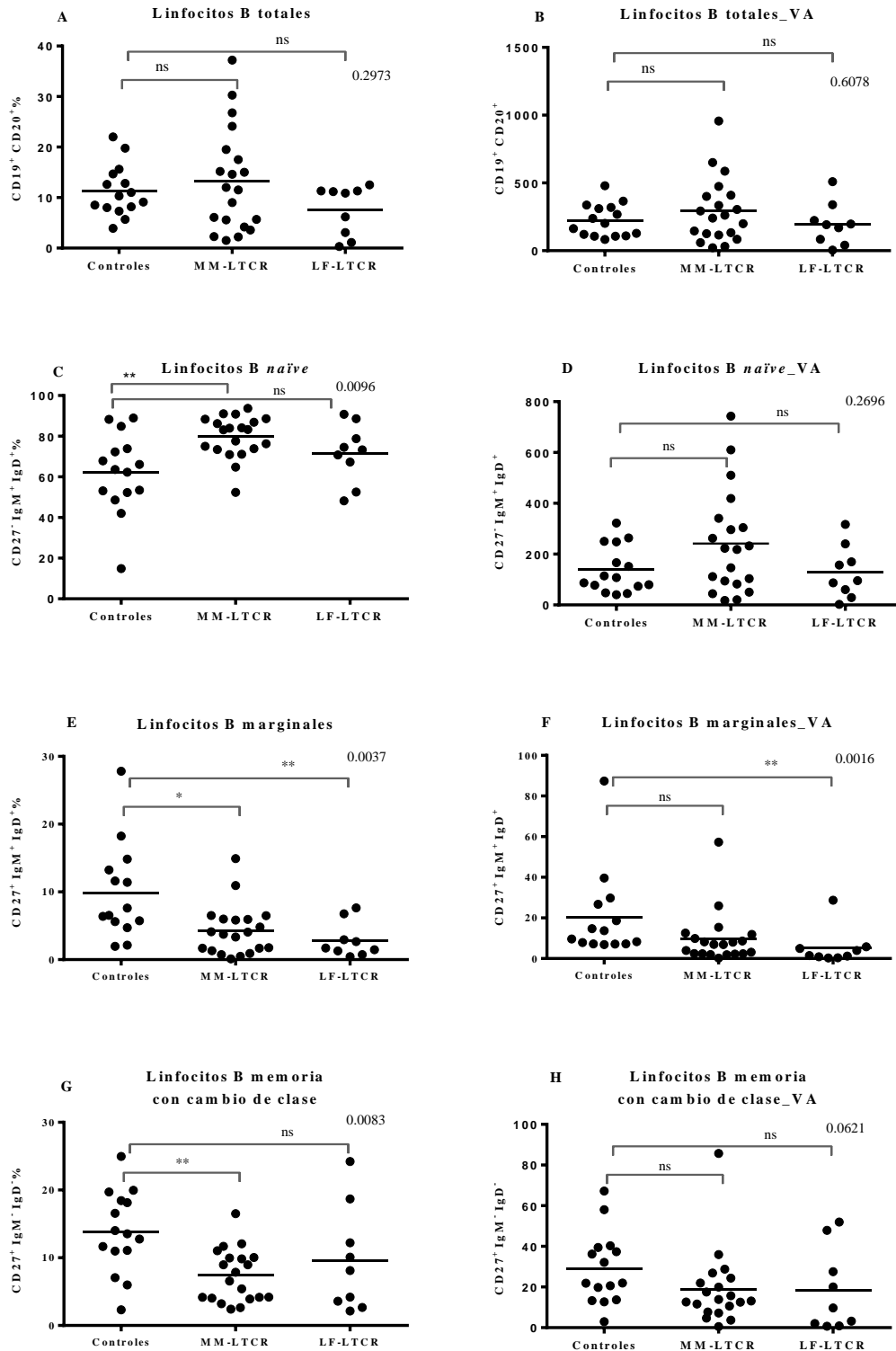
**Figura 15:** Distribución de las subpoblaciones de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> y linfocitos T-CD8<sup>+</sup> en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes LF-LTCR y de los controles sanos de edades parecidas. Se muestra (A) LT-CD4<sup>+</sup> totales en los linfocitos totales, y la proporción en los linfocitos T (LT)-CD4<sup>+</sup> de (B) LT-CD4<sup>+</sup> *naïve* (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), (C) LT-CD4<sup>+</sup> de memoria efectoros (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) y el valor absoluto de (D) LT-CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), (E) LT-CD4<sup>+</sup> *naïve* y (F) LT-CD4<sup>+</sup> de memoria efectoros. Con respecto a los LT-CD8<sup>+</sup> se muestra (G) LT-CD8<sup>+</sup> en los linfocitos totales, y la proporción en los LT-CD8<sup>+</sup> de (H) LT-CD8<sup>+</sup> *naïve*, (I) LT-CD8<sup>+</sup> de memoria efectoros y el valor absoluto de (J) LT-CD8<sup>+</sup>, (K) LT-CD8<sup>+</sup> *naïve* y (L) LT-CD8<sup>+</sup> de memoria efectoros. El valor numérico de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Kruskal-Wallis. El análisis entre grupos se realizó mediante el test *a posteriori* de Bonferroni indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

### 1.5.2. Caracterización de linfocitos B

*Los pacientes LF-LTCR también presentan una mayor proporción de linfocitos B naïve y un descenso de los linfocitos B marginales y células B memoria con cambio de clase en sangre periférica.*

La distribución de LB en la SP de los pacientes LF-LTCR resultó ser muy similar a la obtenida en los pacientes MM-LTCR. A pesar de que tampoco se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de LB totales (figura 16A), el porcentaje de LB naïve resultó ser significativamente mayor en los pacientes que en los controles sanos ( $p=0.0096$ ; figura 16C). Se observa también una reducción significativa de los LB de zona marginal ( $p=0.0037$ ; figura 16E) y de los LB memoria con cambio de clase ( $p=0.0083$ ; figura 16G). Los valores absolutos de los LB de zona marginal y memoria con cambio de clase son también menores que en los controles (figura 16F y 16H).

No se encontraron diferencias en los LB transicionales ( $CD27^-CD10^+CD38^+$ ) ni en la subpoblación de los plasmablastos en SP ( $CD19^+CD20^-CD27^{++}CD38^{++}$ ) (datos no mostrados).



**Figura 16:** Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica de los pacientes MM-LTCR, de los pacientes LF-LTCR y de los controles sanos de edades parecidas. Se muestra la proporción de (A) LB ( $CD19^+CD20^+$ ) sobre los linfocitos totales y la proporción en linfocitos B (LB) totales de (C) LB-naïve ( $CD27^+IgD^+IgM^+$ ), (E) LB marginales ( $CD27^+IgD^+IgM^+$ ) y (G) LB memoria con cambio de clase ( $CD27^+IgD^+IgM^+$ ). También se muestran los valores absolutos (VA) de (B) LB, (D) LB naïve, (F) LB marginales y (H) LB memoria con cambio de clase. El valor numérico en el cuadrante superior derecho de las figuras corresponde al valor “p” obtenido mediante el test Kruskal-Wallis. El análisis entre grupos se realizó mediante el test *a posteriori* de Bonferroni indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ . Las escalas varían dependiendo de la subpoblación celular analizada.

## **2. Evaluación de las cadenas pesadas ligeras como factor de riesgo de recaída en pacientes con mieloma múltiple sometidos a TASPE**

### **2.1. Estudio de las cadenas pesadas ligeras en los pacientes con mieloma múltiple IgG**

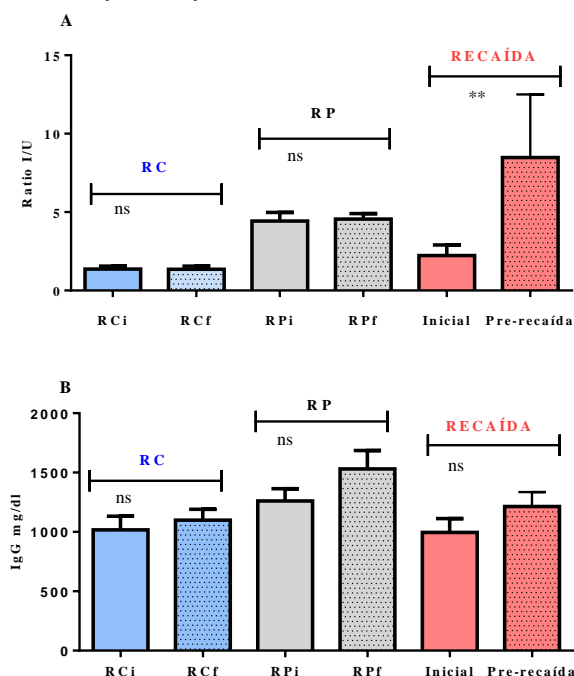
De los 44 pacientes con MM sometidos a TASPE incluidos en el estudio retrospectivo, 30 eran MM de tipo IgG (19 IgGκ, 11 IgGλ). De éstos, y según su estado de RC al finalizar el periodo de seguimiento, se establecieron tres grupos distintos de pacientes IgG: grupo RC con IFJ negativa (14 pacientes), grupo RP (5 pacientes) y grupo en recaída (11 pacientes).

Tras comparar la media de los valores estudiados de cada grupo al principio y al final del seguimiento (Ig totales, cCLL y las HLC), sólo el ratio de cadena involucrada/cadena no involucrada (rI/U) resultó ser mayor en las muestras pre-recaída que en las muestras basales ( $8,49 \pm 4,01$  vs  $2,23 \pm 0,67$ ;  $p = 0.012$ ) en el grupo de pacientes en recaída. En los grupos de pacientes en RC y RP, el rI/U permanece constante entre las muestras basales y finales ( $(1,37 \pm 0,18$  vs  $1,35 \pm 0,19$  ( $p=0.98$ );  $4,43 \pm 0,55$  vs  $4,55 \pm 0,35$  ( $p=0.84$ )). Sin embargo, y probablemente debido a la presencia del CM en el grupo de pacientes en RP, los valores del rI/U son más altos en el grupo RP que en el grupo RC, tanto en las muestras basales ( $4,43 \pm 0,55$  vs  $1,37 \pm 0,18$ ) como en las finales ( $4,55 \pm 0,35$  vs  $1,35 \pm 0,19$ ) (tabla 13 y figura 17A).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de parámetros analizados (IgG totales, cHLC y cCLL) en ninguno de los tres grupos de pacientes. Sin embargo, se observó un aumento progresivo de los niveles totales de IgG entre las muestras basales y finales en el grupo de pacientes en recaída ( $996,3 \pm 115,4$  vs  $1213,0 \pm 122,5$ ) y en los pacientes en RP ( $1260,0 \pm 103,5$  vs  $1530,0 \pm 155,9$ ) (tabla 13). En el grupo de pacientes en RC no se observó tal aumento ( $1017,0 \pm 115,4$  vs  $1099,0 \pm 91,71$ ) (tabla 13 y figura 17B).

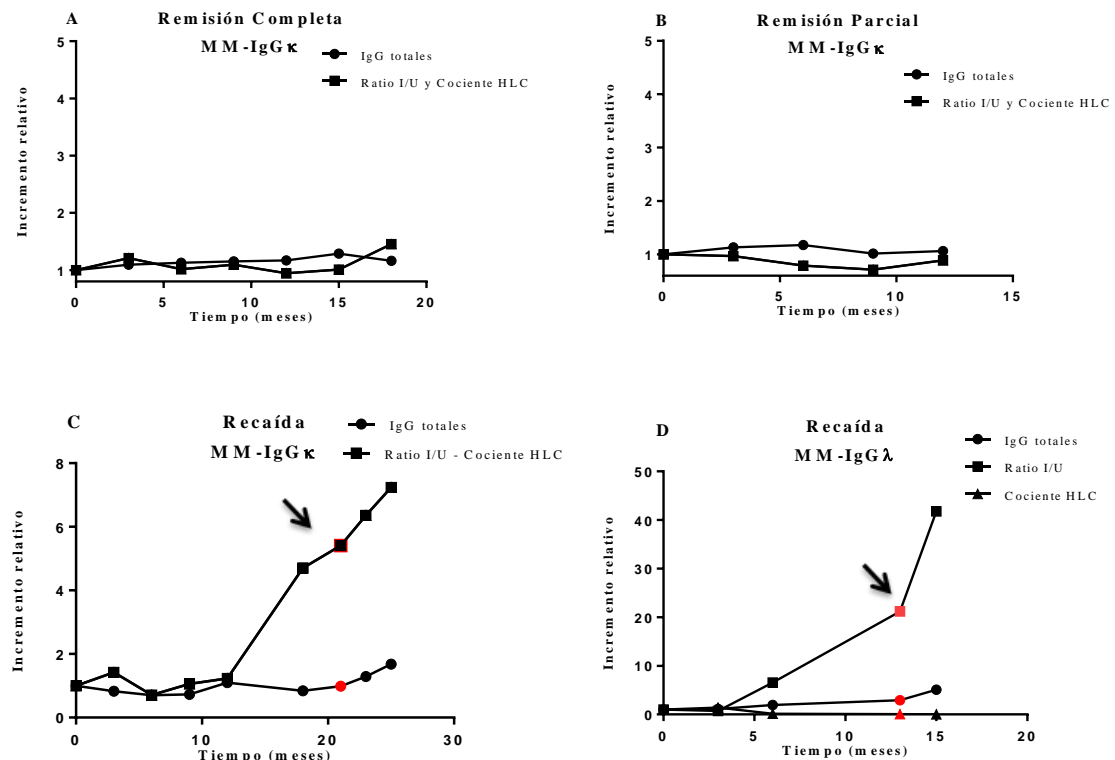
MM-IgG (n=30)		Muestras de suero	
Pacientes en recaída (n=11)	Basal	Pre-recaída	p
IgG totales (mg/dl, media±DS)	996,3± 5,4	1213,0±22,5	0.26
rI/U (media±DS)	2,23± 0,67	8,49 ± 4,01	0.01
cHLC (alterado/normal) (%)	7/4 (64/36)	10/1 (91/9)	0.31
cCLL (alterado/normal) (%)	5/6 (45/65)	7/4 (64/36)	0.66
Pacientes en remisión completa (RC; n=14)	Basal	Final	p
IgG totales (mg/dl, media±DS)	1017,0±15,4	1099,0±91,71	0.64
rI/U (media±DS)	1,37± 0,18	1,35 ± 0,19	0.98
cHLC (alterado/normal) (%)	9/5 (64/36)	5/9 (36/64)	0.25
cCLL (alterado/normal) (%)	3/11 (21/79)	2/12 (14/86)	1.00
Pacientes en remisión parcial (RP; n=5)	Basal	Final	p
IgG totales (mg/dl, media±DS)	1260,0±103,5	1530,0±155,9	0.22
rI/U (media±DS)	4,43± 0,55	4,55 ± 0,35	0.84
cHLC (alterado/normal) (%)	2/3 (40/60)	2/3 (40/60)	1.00
cCLL (alterado/normal) (%)	2/3 (40/60)	4/1 (80/20)	0.52

**Tabla 13:** Cuantificación de inmunoglobulinas totales IgG, cociente cadenas pesadas ligeras y cocientes cadenas ligeras libres en el suero de los pacientes con MM-IgG trasplantados al principio y al final del seguimiento. Se muestran los valores medios de las inmunoglobulinas totales (IgG) y del ratio cadena involucrada/no involucrada (rI/U) así como de los cocientes cadenas ligeras libres (cCLL) y cadenas pesadas ligeras (cHLC), obtenidos en las muestras basales y las finales en el grupo RC y RP o en las muestras pre-recaída en el grupo en recaída. DS: Desviación estándar, RC: Remisión completa, RP: Remisión parcial; Ig: inmunoglobulina; cHLC: cociente cadenas pesadas ligeras; cCLL: cociente cadenas ligeras libres. cHLC normal si  $\geq 1.3$  y  $\leq 3.7$  y cHLC alterado si  $< 1.3$  ó  $> 3.7$ . cCLL normal si  $\geq 0.25$  y  $\leq 1.66$  y cCLL alterado si  $< 0.25$  ó  $> 1.66$ .



**Figura 17:** Representación de los valores medios del ratio cadena involucrada/no involucrada y de los niveles de inmunoglobulina G totales en el suero de los pacientes al principio y al final del seguimiento en los grupos estudiados. (A) El ratio cadena involucrada/no involucrada (rI/U) y (B) los niveles totales de inmunoglobulina G (IgG) (mg/dL); RC: remisión completa; RP: remisión parcial; RCi: RC inicial; RCf: RC final; RPi: RP inicial; RPf: RP final. El análisis entre grupos se realizó mediante el test MannWhitney indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ .

Asimismo, en la figura 18 se muestra un ejemplo representativo de la evolución de los niveles de IgG totales, del rI/U y del cHLC en el suero de un paciente MM-IgG de cada grupo. En el grupo de pacientes con MM-IgG en RC y RP los valores permanecen constantes durante el seguimiento (figura 18A y 18B). Sin embargo, en el grupo de pacientes con MM-IgG en recaída, el rI/U aumenta de manera precoz en los 2-3 meses previos a la recaída con respecto a los niveles totales de IgG en MM-IgGκ (flecha; figura 18C) y con respecto a los niveles IgG y al cHLC en los MM-IgGλ (flecha; figura 18D)



**Figura 18:** Evolución de los niveles de inmunoglobulina G totales, del ratio cadena involucrada/no involucrada y del cociente cadenas pesadas ligeras en un paciente representativo de cada uno de los grupos estudiados. (A) Paciente MM-IgGκ en remisión completa; (B) paciente MM-IgGκ en remisión parcial y (C) paciente MM-IgGκ en recaída y (D) paciente MM-IgGλ en recaída. La flecha y el punto rojo indica el momento pre-recaída de los pacientes “en recaída” MM-IgGκ y MM-IgGλ. Inmunoglobulina G (IgG); ratio cadena involucrada/no involucrada (rI/U); cociente cadenas pesadas ligeras (cHLC).



## 2.2. Cadenas pesadas ligeras en pacientes con mieloma múltiple IgA

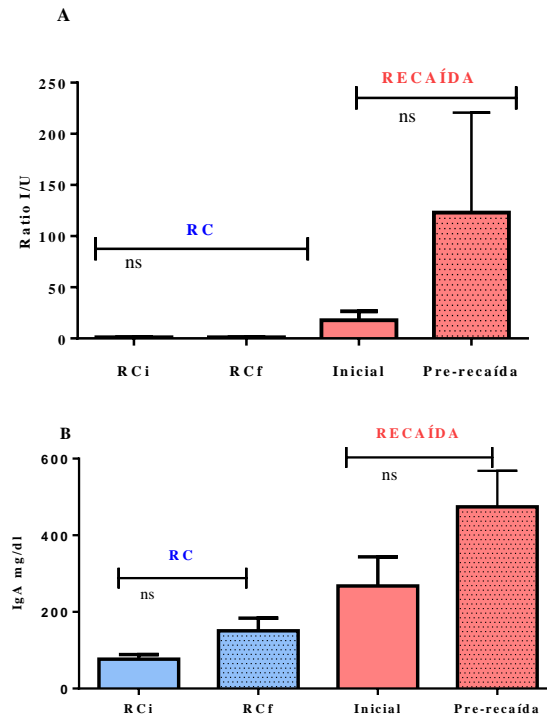
De los 44 pacientes con MM sometidos a TASPE incluidos en el estudio retrospectivo, 14 eran de tipo IgA (9 IgA $\kappa$  y 5 IgA $\lambda$ ). Al final del seguimiento, el 50% de los pacientes se encontraban en recaída (n=7), mientras que el otro 50% de los pacientes estaban en RC (n=7) (tabla 14).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados: niveles totales de IgA, rI/U, cHLC, cCLL (tabla 14). Sin embargo, el rI/U resultó ser mayor en las muestras MM-IgA pre-recaída que en las muestras basales ( $123.0 \pm 97.6$  vs  $17.7 \pm 8.7$ ; tabla 14 y figura 19A). Con respecto a los niveles totales de IgA, no sólo se observa el aumento esperable en las muestras pre-recaída del grupo en recaída sino también un aumento de los niveles en las muestras finales con respecto a las basales en el grupo RC (figura 19B). Este aumento en las muestras finales del grupo RC no se observa con los valores del ratio I/U (figura 19A).

Asimismo, cabe destacar que el 83,3% de los pacientes en recaída tuvieron un rI/U >4 en muestras pre-recaída, mientras que ninguno de los pacientes en RC tuvo un rI/U >2 durante el seguimiento (p=0,02) (datos no mostrados).

MM-IgA (n=14)		Muestras de suero	
Pacientes en recaída (n=7)	Basal	Pre-recaída	p
IgA totales (mg/dL, media $\pm$ DS)	267.8 $\pm$ 75.9	474.1 $\pm$ 94.2	0.16
rI/U (media $\pm$ DS)	17.7 $\pm$ 8.7	123.0 $\pm$ 97.6	0.45
cHLC (alterado/normal) (%)	4/3 (57/43)	6/1 (85/15)	0.54
cCLL (alterado/normal) (%)	3/4 (42/58)	6/1 (85/15)	0.24
Pacientes en remisión completa (RC; n=7)	Basal	Final	p
IgA totales (mg/dL, media $\pm$ DS)	76.9 $\pm$ 11.9	150.9 $\pm$ 32.5	0.13
rI/U (media $\pm$ DS)	1.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	0.90
cHLC (alterado/normal) (%)	0/7 (0/100)	0/7 (0/100)	1
cCLL (alterado/normal) (%)	1/6 (14/86)	1/6 (14/86)	1

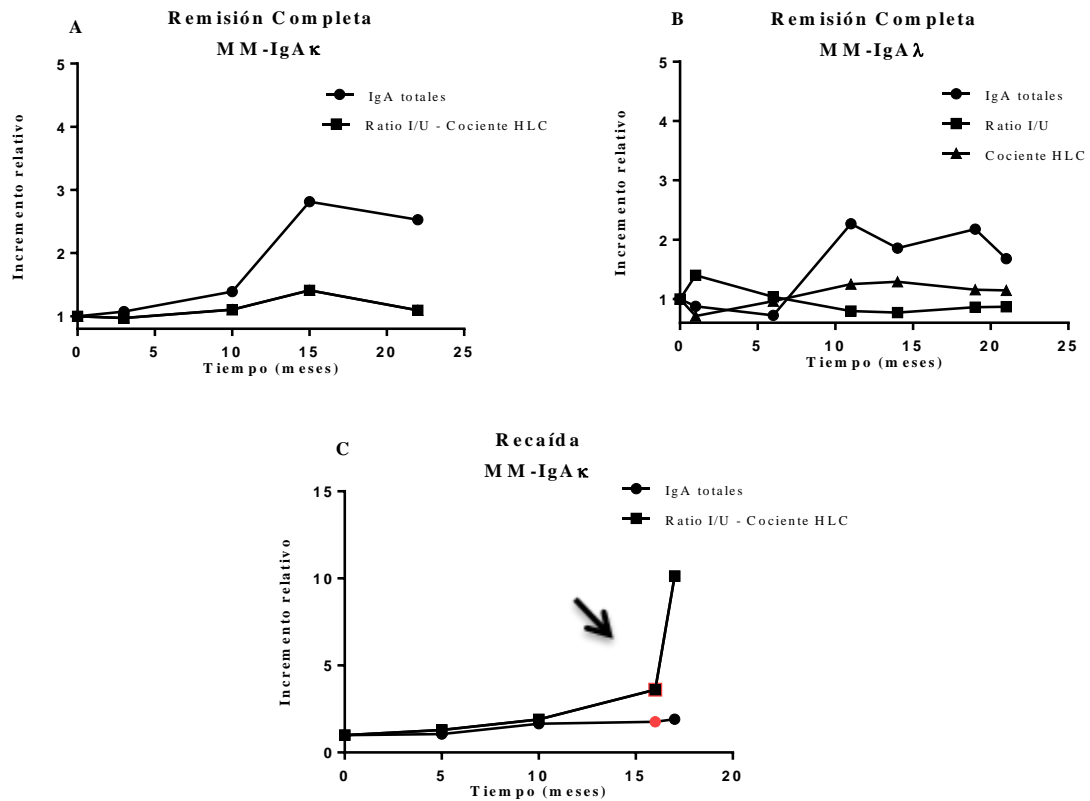
**Tabla 14:** Cuantificación de inmunoglobulinas A totales, cociente cadenas pesadas ligeras y cocientes cadenas ligeras libres en el suero de los pacientes con MM-IgG trasplantados al principio y al final del seguimiento. Se muestran los valores medios de las inmunoglobulinas A (IgA) totales y del ratio cadena involucrada/no involucrada (rI/U) así como de los cocientes cadenas ligeras libres (cCLL) y cadenas pesadas ligeras (cHLC), obtenidos en las muestras basales y las finales en el grupo RC y RP o pre-recaída en el grupo en recaída. DS: Desviación estándar, RC: Remisión completa, RP: Remisión parcial; Ig: inmunoglobulina; I/U: cadena involucrada/no involucrada; cHLC normal si  $\geq 1.3$  y  $\leq 3.7$  y cHLC alterado si  $< 1.3$  ó  $> 3.7$ . cCLL normal si  $\geq 0.25$  y  $\leq 1.66$  y cCLL alterado si  $< 0.25$  ó  $> 1.66$ .



**Figura 19:** Representación de los valores medios del ratio cadena involucrada/no involucrada y de los niveles de inmunoglobulina A totales en el suero de los pacientes al principio y al final del seguimiento en los grupos estudiados. (A) El ratio cadena involucrada /no involucrada (rI/U) y (B) los niveles totales de IgA (mg/dL). Inmunoglobulina A (IgA); RC: remisión completa; RP: remisión parcial; RCi: RC inicial; RCf: RC final; RPi: RP inicial; RPf: RP final. El análisis entre grupos se realizó mediante el test MannWhitney indicándose \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$  y “ns” si  $p \geq 0.05$ .

En la figura 20, se muestra la evolución de los niveles de IgA, del cHLC y del rI/U en dos pacientes en RC (uno IgA $\kappa$  y otro IgA $\lambda$ ) y en un paciente en recaída (uno IgA $\kappa$ ). Como se observa, los valores de IgA total en los pacientes en RC varían de forma notable a lo largo del tiempo mientras que los valores del rI/U y del cHLC (figura 20A y 20B) son mucho más estables.

En el grupo de pacientes en recaída, tal y como se observa en la figura 20C se observa un aumento precoz del rI/U (y del cHLC) con respecto a los niveles totales de IgA en los 2-3 meses pre-recaída (flecha).



**Figura 20:** Evolución de los niveles de inmunoglobulina A totales, del ratio cadena involucrada/no involucrada y del cociente cadenas pesadas ligeras en un paciente representativo de cada uno de los grupos estudiados. (A) Paciente MM-IgA $\kappa$  en remisión completa; (B) paciente MM-IgA $\lambda$  en remisión completa y (C) paciente MM-IgA $\kappa$  en recaída. La flecha y el punto rojo indica el momento pre-recaída de los grupos “en recaída” MM-IgA $\kappa$ . Inmunoglobulina A (IgA); ratio cadena involucrada/no involucrada (rI/U); cociente cadenas pesadas ligeras (cHLC).

## ***DISCUSIÓN***

Aproximadamente, sólo un 15% de los pacientes con MM trasplantados permanecen en RC durante más de 10 años. En estos pacientes la tasa de recaída es muy baja<sup>154 155</sup> y podrían haber alcanzado la “curación operacional” de su mieloma<sup>156</sup> gracias, al menos en parte, a una reconstitución inmunitaria característica que favorece el mantenimiento de una RC de larga duración posTASPE. En este sentido, la importancia del SI en MM se conocía por los estudios realizados sobre el efecto del injerto contra MM tras aloTPH<sup>157</sup>, la infusión de linfocitos del donante en pacientes en recidiva o con EMR tras alo-TPH<sup>158</sup> y la mejora de las tasas de respuesta con el tratamiento con IMiDs a largo plazo. Asimismo, otras evidencias, como la recuperación de la inmunidad humoral al año posTASPE<sup>39</sup> o una pronta recuperación del número absoluto de linfocitos<sup>125 126 127</sup> y/o de la subpoblación de células NK posTASPE<sup>159</sup> como biomarcadores predictores de SG en pacientes con MM trasplantados<sup>126</sup> y de nuevo diagnóstico<sup>138</sup>; o la asociación entre el valor absoluto de linfocitos infundidos en la aféresis y la supervivencia<sup>160</sup> apoyan también el papel de la inmunovigilancia en el mantenimiento del estado de LTRC en MM, o dicho de otra manera, el del efecto *graf-versus-mieloma* autólogo a largo plazo.

Por todo ello, el objetivo de esta tesis ha sido estudiar la distribución de las subpoblaciones de LT, LB y células NK y el estado de inmunoparesia en los pacientes MM-LTRC, con la finalidad de identificar un perfil inmunitario característico que pudiera emplearse como un biomarcador relevante en la predicción del pronóstico y de la calidad y duración de la respuesta en pacientes con MM sometidos a TASPE.

En nuestro estudio hemos observado en la SP de los pacientes MM-LTRC, un aumento del porcentaje de los LT-CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria efectores junto a un aumento de los LB *naïve* y una redistribución característica de algunos receptores activadores e inhibidores en las células NK. Este patrón inmunitario se confirmó al cabo de un año en los pacientes MM-LTRC (grupo MM-LTRC +1) y un patrón muy similar se observó también en los pacientes MM-SCR (<5 años en RC), lo que sugiere la adquisición de un estado inmunitario estable que aparece antes de los 5 años posTASPE.

En particular, en la subpoblación de LB evidenciamos un aumento de los LB *naïve* junto a una disminución del número de LB memoria con cambio de clase y de LB marginales, que indican una adecuada regeneración del repertorio de LB y una recuperación de la respuesta inmunitaria humoral en los pacientes MM-LTRC. En la literatura, resultados similares se han descrito por *Pessoa de Magalhães et al*, con la diferencia de que dichos autores no obtienen diferencias significativas entre el grupo MM-LTRC y el grupo control, probablemente debido a la distinta estrategia de análisis de LB utilizada<sup>161</sup>. Además, en dicho estudio, comparan sólo valores absolutos cuya variabilidad individual hace más difícil la obtención de resultados significativos.

Por otro lado, nuestros datos también concuerdan con estudios publicados hace ya muchos años que sugerían que el SI reproducía la ontogenia de las células B tras el TASPE<sup>128</sup>, aunque por aquel entonces, la distinción inmunofenotípica de las subpoblaciones linfocitarias por CMF era mucho más limitada que en la actualidad. Hoy en día, con nuestro estudio, podemos confirmar que, en el postTASPE, se reproduce la ontogenia de los LB que se evidencia con el aumento de los LB *naïve* de los pacientes MM-LTCR y LF-LTCR con respecto a los controles y que aparece al menos, si no antes, a los cinco años del TASPE (pacientes MM-SCR). Estos resultados explicarían los hallazgos postTASPE descritos en la literatura: las IgM de menor afinidad son las que primero recuperan sus niveles, seguidas de las IgG e IgA que pueden tardar más de un año en volver a la normalidad<sup>128 129</sup>. El aumento de los LB *naïve* se mantiene estable en pacientes trasplantados en LTCR, lo cual probablemente garantiza la homeostasis de la RI humoral y favorece el estado de RC de los pacientes. En contrapartida, observamos que los pacientes trasplantados no consiguen alcanzar los niveles normales de LB de memoria con cambio de clase ni de LB marginales. Desconocemos si se trata de un bloqueo madurativo en la diferenciación B o de una alteración de la interacción LB-LT necesaria para regenerar la diversidad de los LB o de ambos. Alternativamente, es posible que hagan falta más años para que los LB *naïve* encuentren el repertorio antigénico suficiente para alcanzar el número de LB de memoria que se detecta en los sujetos sanos adultos.

Sea como fuere, la normalización del cHLC y de los niveles séricos de Igs totales en los pacientes MM-LTCR, refleja la recuperación de las CP normales postTASPE (tabla 12). En concreto, y teniendo en cuenta la IFJ negativa de los pacientes, los valores del cHLC (IgGκ/IgGλ) cercanos al límite inferior de la normalidad en los pacientes MM-LTCR IgGκ e IgAκ, indirectamente indican la presencia de niveles proporcionalmente elevados de la cadena no involucrada, la ausencia de inmunoparesia y, en consecuencia, la recuperación de la respuesta inmunitaria humoral. En los pacientes IgGλ o IgAλ esperaríamos niveles de cHLC (IgGκ/IgGλ) cercanos al límite superior de la normalidad. Por tanto, el cHLC podría tratarse de un marcador de recuperación de la respuesta humoral al reflejar, en los pacientes con IFJ negativa, una recuperación de la cadena no involucrada que indirectamente indica la presencia de CP normales que contribuirían a evitar recaídas. Adicionalmente, la normalización del cHLC de los pacientes MM-LTCR en nuestro estudio apoya la utilidad del cHLC, postulada previamente por Tovar N. *et al*<sup>145</sup>, como marcador de reconstitución inmunitaria en los pacientes trasplantados en RC.

Con respecto a la subpoblación de LT, nuestros resultados confirman su importancia en la mielomagénesis y en la progresión del MM, tal y como ha sido revisado recientemente por Dosani *et al*<sup>135</sup>: durante la enfermedad y sobre todo en los estados pre-malignos del MM, la alteración cuantitativa y funcional de los LT dirige la evolución de la enfermedad. Nuestros pacientes

MM-LTCR se caracterizan por un aumento de los LT-CD4<sup>+</sup> y LT-CD8<sup>+</sup> de memoria efectores, que probablemente garantiza un control eficaz del crecimiento tumoral, una adecuada inmunovigilancia y, por tanto, el establecimiento y mantenimiento de una RC posTASPE. Estos datos están en consonancia con los publicados por *Bryant et al*<sup>142</sup> en un estudio donde demuestran que todos los pacientes MM-LTCR de más de 10 años presentan expansiones de clones de LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos, con un fenotipo de linfocitos de memoria efector CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, en comparación con un grupo heterogéneo de pacientes con menos de 10 años de seguimiento que las presentan en el 54% de los casos.

Sería conveniente realizar estudios funcionales en esta subpoblación de LT que permitieran determinar el subtipo de LT-CD4<sup>+</sup> mayoritario y confirmar la capacidad efectora de los LT-CD4<sup>+</sup> y LT-CD8<sup>+</sup>, lo que reforzaría nuestra hipótesis de su influencia en el control de la enfermedad. Dichos estudios funcionales de LT incluyen ensayos clásicos de proliferación, producción de citocinas y citotoxicidad, bien en respuesta a estímulos policlonales o, idealmente, a antígenos tumorales asociados a mieloma<sup>162</sup> o a células tumorales autólogas<sup>163</sup>.

En cuanto a la recuperación de los valores de normalidad de las principales subpoblaciones linfocitarias T, sabemos que, después del trasplante, la reconstitución inmunitaria comienza con una rápida expansión periférica timo-independiente de linfocitos que, en nuestro estudio, se refleja en el aumento de los LT de memoria efectores, tanto T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup>, en los pacientes MM-SCR con respecto a los MM-LTCR. La recuperación de los valores normales de LT-CD8<sup>+</sup> tras un trasplante autólogo tiene lugar de forma muy rápida, aproximadamente transcurrido un mes<sup>159 164 165</sup> lo que indica que su regeneración depende de aquella expansión extratímica.

Posteriormente, la recuperación de la timopoyesis y la consiguiente generación de nuevos LT *naïve* permitirán aumentar el repertorio T con una mayor diversidad del TCR<sup>128</sup>. Los valores relativos y absolutos de LT-CD4<sup>+</sup> claramente disminuidos de los pacientes MM-SCR con respecto a los MM-LTCR, y la de éstos frente a los controles, refleja la dependencia de la función tímica de dichos linfocitos<sup>166</sup>. Es por tanto posible que la recuperación numérica de los LT-CD4<sup>+</sup> nunca llegue a ser completa después de un TASPE, tal y como se ha descrito en pacientes con linfoma a los 4-10 años postrasplante<sup>132</sup>.

La timopoyesis, el número de LT *naïve* y la diversidad del repertorio es dependiente de la edad del paciente, siendo significativamente menor en pacientes mayores de 40-50 años<sup>133</sup>. La mayoría de nuestros pacientes MM-LTCR eran mayores de 50 años en el momento del TASPE y, después de 6-19 años, no han conseguido alcanzar los niveles de LT *naïve* de los controles sanos. Teniendo en cuenta el número de años en RC posTASPE de los pacientes (>6 años) y,

probablemente debido al daño tímico ocasionado durante la inducción y acondicionamiento preTASPE<sup>167 168</sup> y a la reducida timopoyesis asociada a la edad<sup>133</sup>, es posible que no lleguen a conseguirlos. Resultados similares se han descrito en paciente más jóvenes (18-59 años) trasplantados por linfoma a los 4-10 años postrasplante<sup>132</sup>. Sería interesante, en ese sentido, llevar a cabo un estudio similar en pacientes no trasplantados en LTCR con el objetivo de caracterizar el daño tímico ocasionado durante el trasplante y su influencia en la regeneración del repertorio de LT; si bien habría que tener en cuenta que los pacientes no trasplantados suelen ser pacientes con comorbilidades asociadas o muy ancianos, lo que de por sí afecta a la función tímica y por tanto limitaría dicha comparación.

Por otro lado, como ocurre en otras neoplasias<sup>140</sup>, también en MM se ha descrito un marcado ambiente inmunosupresor, caracterizado por una disfunción de los LT convencionales, un aumento del número de LTreg y del ratio LTreg/Th17, y un aumento de linfocitos T exhaustos o anérgicos, que favorece la recaída y progresión de la enfermedad<sup>135 141 169</sup>. En nuestro trabajo, los niveles normales de LTreg observados en los pacientes MM-LTCR con respecto a los controles sanos, reflejarían la ausencia de un ambiente inmunosupresor que probablemente favorece el estado de RC de los pacientes. *Pessoa de Magalhães et al.*<sup>161</sup> apoyan también esta hipótesis al observar una disminución de los LTreg en la MO de los pacientes MM-LTCR con respecto a pacientes con MM sintomáticos. Por su parte, recientemente se ha demostrado que los pacientes con MM trasplantados y en recaída presentan, a los 3 meses del trasplante y antes de que exista evidencia clínica de enfermedad, un mayor número de LT-exhaustos (CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>)<sup>170</sup>. Por ello, se ha propuesto el ratio de células T-exhaustas/T-senescentes como un biomarcador inmunitario de predicción de recaídas que podría ayudar en la identificación de pacientes que se beneficiarían de una inmunoterapia temprana. En esta tesis no hemos estudiado dicha subpoblación, sin embargo, dado su interés potencial y con el fin de confirmar o descartar su elevación temprana en los pacientes en recaída, hemos iniciado un estudio prospectivo en pacientes con MM sometidos a TASPE.

Al mencionado microambiente inmunosupresor que se genera entorno a las células mielomatosas, también contribuyen células mieloides como los macrófagos asociados a tumor y las células mieloides supresoras<sup>33</sup>. La presente tesis no ha abordado el estudio de dichas subpoblaciones leucocitarias. Sin embargo, estudios muy recientes sugieren la utilidad de la monitorización de sus precursores en SP como biomarcador pronóstico y apoyan su papel patogénico en la progresión tumoral<sup>139</sup>. Más aún, la proporción de células NK y monocitos CD14<sup>+</sup>DR<sup>low/-</sup> en el producto de infusión condiciona la SG postTASPE en pacientes con linfoma<sup>171</sup>.

Para concluir la caracterización inmunofenotípica de las subpoblaciones linfocitarias B y T, y con el fin de determinar si este patrón inmunitario es específico de pacientes con MM tras-



plantados, se analizó el IF de pacientes trasplantados por linfoma en RC de larga duración (LF-LTCR). Los resultados mostraron un perfil inmunitario de LT y LB muy similar al de los pacientes MM-LTCR, lo que parece indicar que se trata, al menos numéricamente, de un perfil inmunitario característico de pacientes trasplantados en LTCR pero no específico de pacientes MM-LTCR. Por tanto, y aunque probablemente influenciado por el trasplante, se trata de un patrón inmunitario fundamental en el mantenimiento de una LTCR, que garantiza una inmunovigilancia eficaz por parte de los LT efectores y una adecuada recuperación de la homeostasis humoral por parte de los LB.

La función de la subpoblación de células NK está controlada por el balance entre las señales activadoras e inhibidoras de sus receptores de membrana, y se ha demostrado que su actividad es importante en la progresión de la enfermedad, no sólo en neoplasias hematológicas incluyendo MM, sino también en distintos tumores sólidos <sup>172</sup>. Sus receptores activadores, que incluyen los NCRs (Nkp46, Nkp30), NKG2D y DNAM entre otros, están implicados en el reconocimiento y eliminación de células tumorales <sup>173 174</sup>, mientras que sus receptores inhibidores (KIRs y NKG2A, entre otros) evitan la citólisis de células propias por parte de las células NK.

A diferencia de la disminución descrita en los pacientes con MM sintomáticos, en ninguno de nuestros pacientes en RC observamos diferencias significativas en el número de células NK totales con respecto a los controles sanos, lo que apoya la importancia de las células NK en MM y refleja la recuperación numérica de las células NK posTASPE previamente descrita <sup>135</sup>. Sin embargo, observamos una disminución del número de receptores activadores como DNAM y Nkp46 junto a un aumento de la expresión de moléculas inhibidoras NKG2A y KIR2DL1 en los pacientes MM-LTCR, lo que parece indicar que las señales inhibidoras dominan sobre las activadoras durante el estado de RC. Curiosamente, los pacientes MM-LTCR tienen un fenotipo similar al descrito en las fases más avanzadas de la enfermedad <sup>135 173</sup>, así como al asociado al fallo en alcanzar una RC en pacientes con leucemia mieloide aguda al diagnóstico: un aumento de la expresión de NKG2A y una disminución de Nkp46 <sup>175</sup>. Es posible que durante las primeras etapas posTASPE o incluso antes, tenga lugar una actividad citotóxica continua a través de los receptores activadores que favorezca el establecimiento de una RC. Esto supondría, a su vez, una regulación negativa de estos receptores (DNAM y Nkp46) y un aumento de la expresión de los receptores inhibidores (NKG2A y KIR2DL1), dando lugar al fenotipo característico de las células NK con diferenciación terminal <sup>176</sup> que observamos en nuestros pacientes MM-LTCR.

Con respecto a la molécula NKG2D, además de ser un receptor activador de células NK, funciona como coestimulador en los LT-CD8<sup>+</sup> naïve <sup>177</sup>. La subpoblación específica de LT-CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> se ha descrito como una subpoblación importante en la identificación y eliminación de células mielomatosas <sup>178</sup>. Curiosamente y aunque sin significación estadística, encon-

tramos una reducción de esta subpoblación de LT en los pacientes MM-LTCR con respecto a los controles (datos no mostrados). Este hecho podría estar reflejando una expansión de LT-CD8<sup>+</sup> diferenciados, en consonancia con el mayor porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> de memoria efectores que observamos en los pacientes MM-LTCR.

En virtud de todas las evidencias mencionadas, podemos comprender que la vigilancia inmunológica sea uno de los principales objetivos de las terapias actuales debido a que la disfunción inmunitaria está relacionada con el desarrollo y la progresión de la enfermedad<sup>37 135</sup>. En este sentido se están llevando a cabo distintas terapias celulares experimentales con células dendríticas pulsadas con Ag tumorales, LT citotóxicos y células NK autólogos expandidos *ex vivo*, células NK alogénicas con disparidad KIR, LT genéticamente modificados (*CAR-T cells*), etc. Además de ello, los LT y las células NK contribuyen de forma muy relevante a los mecanismos de acción de la inmunoterapia, en particular de los fármacos inmunomoduladores y AcMo, ya sea dirigidos frente a moléculas expresadas por las células mielomatosas (*Elotuzumab*, *Daratumumab*), o frente a moléculas capaces de modular el SI (PD-1/PDL-1)<sup>179</sup> cuyo mecanismo de acción es el de potenciar esta inmunovigilancia frente a las células tumorales. No es casualidad que los fármacos más eficaces en la terapia de mantenimiento posTASPE sean la lenalidomida y bortezomib, cuya actividad anti-MM se basa en potenciar la actividad de los diferentes linfocitos citotóxicos (LT citotóxicos, células NK y células NKT), en la inhibición de los LTregs o en el bloqueo del eje PD1/PDL1<sup>180</sup>. Asimismo, estos fármacos también han demostrado aumentar la actividad anti-MM de los AcMo<sup>181,182</sup>. Actualmente son varios los ensayos clínicos en curso que combinan el tratamiento de los “checkpoints” (*Nivolumab*, *Pidilizumab*, *Pembrolizumab*) con IMiDs, con el fin de mejorar su eficacia clínica<sup>179 183 184</sup>.

En síntesis, nuestro estudio profundiza en el conocimiento del perfil inmunitario que puede estar favoreciendo el mantenimiento de una LTCR en pacientes trasplantados. Consiste en un incremento de LT efectores y células NK diferenciadas que permiten una vigilancia inmunitaria competente, junto con un aumento de células B *naïve* que garantiza la homeostasis de la respuesta humoral, incluyendo la recuperación de las CP normales que podrían competir con las CPM por sus nichos en la MO. Esta reposición de células B contribuye asimismo a la ausencia de inmunoparesia, que actualmente puede ser definida de forma más precisa como la supresión de la cadena no involucrada del mieloma, gracias al ensayo HLC.

Esta inmunoparesia se ha asociado a un mayor riesgo de progresión en GMSI<sup>40</sup> y a un peor pronóstico en pacientes refractarios y de nuevo diagnóstico<sup>41</sup>. Además, el ensayo HLC permite calcular el cHLC (IgGκ/IgGλ o IgAκ/IgAλ), postulado como un marcador de competencia inmunitaria en pacientes en RC posTASPE<sup>145</sup> y cuya normalización se ha asociado a una mayor supervivencia en MM<sup>43</sup>, y el rI/U (ej: IgGλ/IgGκ en un paciente MM-IgGλ o IgGκ/IgGλ en un

paciente MM-IgGκ), un biomarcador que refleja cuantitativamente el aumento de la cadena monoclonal involucrada y la disminución de la cadena policlonal no involucrada del MM. Este rI/U se ha descrito como un factor pronóstico independiente en pacientes con MM<sup>185</sup> e, igual que en las GMSI en las que se observa un aumento progresivo del CM sérico (también llamadas GMSI *evolving*)<sup>186</sup>, se ha propuesto como un marcador capaz de identificar pacientes con GMSI con mayor riesgo de progresión<sup>146</sup>.

En MM, las respuestas al tratamiento son muy heterogéneas y más del 50% de los casos ocurren sin datos clínicos de la enfermedad, por lo que es fundamental disponer de marcadores de recaída<sup>136 137</sup> que nos permitan identificar pacientes que se beneficiarían de un tratamiento precoz. En este sentido, es cierto que independientemente de la edad y del riesgo<sup>98</sup>, el estudio de EMR es el principal factor de supervivencia en MM, tanto en pacientes trasplantados<sup>69</sup> como en pacientes no trasplantados, siendo un criterio esencial en la monitorización y evaluación de la respuesta<sup>99 104 187</sup>. Sin embargo, no es posible realizar un aspirado de MO cada pocos meses. Por ello, nuestro objetivo ha sido evaluar el valor del test HLC, factible en muestras de suero, en la predicción de recaídas en pacientes con MM en RC posTASPE.

Así, en los pacientes con MM-IgGκ e IgGλ que recaerán, observamos una elevación precoz del rI/U y diferencias significativas del mismo entre las muestras basales y las de pre-recaída. En concreto, el r I/U se eleva antes que los niveles de Igs y antes que el cHLC en los pacientes IgGλ. Sin embargo, los valores que clásicamente se emplean en el seguimiento de los pacientes con MM como son las Ig totales, el cCLL o la IFJ de suero, no anticipan la recaída. Esto refuerza la utilidad del ensayo HLC, y más concretamente del rI/U, en la identificación de pacientes trasplantados con MM-IgG que en RC tienen mayor riesgo de progresión. También en los pacientes con MM-IgA en recaída se observa una diferencia del rI/U (17.7 vs 123) proporcionalmente mayor que la observada para los niveles de IgA totales (267.8 vs 474.1), aunque no alcanza significación estadística probablemente debido al escaso número de pacientes con MM-IgA analizados.

En cuanto a las posibles explicaciones para este hallazgo, dado que el rI/U es presumiblemente el parámetro que mejor refleja el descenso de la cadena no involucrada del mieloma, postulamos que la supresión de las CP normales podría ser un requisito para la recaída de la enfermedad, tal y como se ha sugerido en la transformación de la GMSI a MM<sup>146</sup>. En nuestra cohorte hay un 50% de pacientes con MM-IgA en recaída al final del seguimiento. Este hallazgo coincide con el peor pronóstico asociado al MM-IgA, que puede deberse al menor peso de la producción de la cadena IgA no involucrada en la recaída, en virtud de los menores niveles totales de IgA que hay en individuos sanos. Lo mismo ocurre en la transformación de la GMSI IgA<sup>146</sup>.

Dicho de otra manera, nuestros resultados apoyan la idea de que niveles elevados de cadena no involucrada, y por tanto niveles elevados de CP normales, podrían evitar la invasión de CP clonales en los nichos medulares y la aparición de recaídas, tal y como se ha demostrado en un modelo experimental por *Paiva et al*<sup>188</sup>. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales que permitan confirmar si esta disminución de la cadena no involucrada (traducida como un aumento del rI/U) precede a la recaída de la enfermedad.

Por su parte, aunque el rI/U se mantiene constante en el tiempo en el grupo de pacientes con MM-IgG en RP y en RC, los niveles basales del rI/U son más elevados en los pacientes en RP que en los pacientes en RC (4.43 vs 1.37), no siendo esta diferencia tan marcada proporcionalmente en los niveles basales totales de IgG (1017 vs 1260). Por tanto, postulamos que, además de la evidente influencia de la presencia del CM en el aumento del rI/U, esta diferencia podría también estar favorecida por una inmunosupresión moderada de la cadena no involucrada inducida por el CM en los pacientes en RP, lo que podría indicar la necesidad de una monitorización más estrecha en los mismos.

Adicionalmente, la normalización del cHLC en los pacientes en MM-LTCR con EMR negativa (tabla 12) indican la ausencia de inmunoparesia y la recuperación de la respuesta humoral normal<sup>145</sup>, apoyando así la utilidad del ensayo HLC como un marcador de competencia inmunitaria en pacientes trasplantados. Por tanto, y aunque son necesarios más estudios de validación, nuestros resultados apoyan la utilidad del ensayo HLC no sólo como marcador precoz de recaídas de pacientes en RC sino también como marcador de la competencia inmunitaria en pacientes trasplantados.

En resumen, nuestro estudio supone un primer paso en la definición del papel de los estudios inmunológicos para la identificación de distintos grupos de pacientes en términos de respuesta terapéutica al TASPE. De forma similar, *Paiva et al* han publicado recientemente que el perfil inmunológico en la MO puede contribuir a la identificación de pacientes con pronósticos distintos entre los pacientes con MM no candidatos al trasplante<sup>98</sup>.

Estudios prospectivos similares que evalúen la respuesta inmunitaria tanto al TASPE como a las nuevas terapias, son fundamentales para poder determinar si el patrón de recuperación inmunitaria alcanzado en los pacientes MM-LTCR garantiza, al menos en parte, el mantenimiento de la RC de los pacientes. Asimismo, sería conveniente analizar el perfil inmunitario de los pacientes en RP de larga supervivencia y de los pacientes que alcanzan RC sin TASPE. Estos últimos nos permitirán dilucidar si la distribución de las subpoblaciones linfocitarias descritas en esta tesis, es consecuencia del TASPE o de la quimioterapia preTASPE. No menos im-

portante será determinar si este perfil inmunitario aparece al diagnóstico cuando el SI es todavía competente.

En otras palabras, estos estudios inmunológicos nos permitirán evaluar, en el escenario terapéutico actual, con nuevos fármacos y estrategias de mantenimiento, el papel de la reconstitución inmunitaria de los pacientes con MM; y aportarán luz sobre la patogénesis del MM y el perfil inmunitario idóneo para garantizar una RC, que serán, a su vez, claves para el desarrollo de nuevas inmunoterapias y, llegado el caso, para la curación en estos enfermos.

## ***CONCLUSIONES***

1. Los pacientes con MM-LTCR sometidos a TASPE presentan un perfil inmunitario estable que se caracteriza por:
  - a. Un mayor número de LT de memoria efectora que pueden garantizar una inmunovigilancia eficaz.
  - b. Un aumento de los LB *naïve* que reflejan una adecuada recuperación de la homeostasis humoral.
  - c. Un fenotipo de células NK semejante al de las células NK con diferenciación terminal.
2. Este patrón inmunitario aparece durante los primeros años posTASPE y se mantiene estable en el tiempo.
3. Este perfil inmunitario parece asociarse al TASPE y no a la patología de base, ya que, al menos numéricamente, es similar al observado en pacientes trasplantados por linfoma en LTCR.
4. Dada la importancia del sistema inmunitario en el MM, es probable que este patrón inmunitario contribuya al mantenimiento del estado de RC y a evitar recaídas, siendo recomendable su estudio para la identificación de nuevos biomarcadores en MM.
5. El ratio de la Ig involucrada/no involucrada podría tratarse de un buen biomarcador, más útil que los niveles de Igs totales y que las CLL, en la predicción precoz de recaídas en pacientes con MM posTASPE.
6. El cHLC está normalizado en los pacientes MM-LTCR, por lo que también podría tratarse de un buen marcador de competencia inmunitaria.

## ***BIBLIOGRAFÍA***



1. Smith D, Yong K. Multiple myeloma. *BMJ* 2013;346(June):f3863. doi:10.1136/bmj.f3863.
2. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 2016;91(7):719-734. doi:10.1002/ajh.24402.
3. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin. Proc.* 2003;78(1):21-33. doi:10.4065/78.1.21.
4. Bladé J, Fernández de Larrea C, Rosiñol L, Cibeira MT, Jiménez R, Powles R. Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(28):3805-12. doi:10.1200/JCO.2011.34.9290.
5. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113(22):5412-7. doi:10.1182/blood-2008-12-194241.
6. Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar S V, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24(6):1121-7. doi:10.1038/leu.2010.60.
7. Rajkumar SV, Landgren O, Mateos M-V. Smoldering multiple myeloma. *Blood* 2015;125(20):3069-75. doi:10.1182/blood-2014-09-568899.
8. Dhakal B, Girnius S, Hari P. Recent advances in understanding multiple myeloma. *F1000Research* 2016;5. doi:10.12688/f1000research.8777.1.
9. The Immune System (First of Two Parts). *N. Engl. J. Med.* 2000;343(15):1132-1132. doi:10.1056/NEJM200010123431520.
10. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier, Saunders; 2015.
11. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401(6754):708-712. doi:10.1038/44385.
12. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets : Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 2004;22(1):745-

763. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
13. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* 2007;19(6):652-657. doi:10.1016/j.coi.2007.07.020.
14. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Immunol.* 2013;25(2):214-21. doi:10.1016/j.coi.2012.12.003.
15. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 2011;12(6):492-9.
16. Chung DJ, Pronschinske KB, Shyer JA, et al. T Cell Exhaustion/Senescence in Relapsed Multiple Myeloma after Autologous Stem Cell Transplantation. *Blood* 2015;126(23).
17. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* 2010;78B(S1):S47-S60. doi:10.1002/cyto.b.20547.
18. Stavnezer J. Antibody class switching. *Adv. Immunol.* 1996;61:79-146.
19. Neuberger MS, Milstein C. Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 1995;7(2):248-54.
20. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi B-I, Nagasawa T. Cellular Niches Controlling B Lymphocyte Behavior within Bone Marrow during Development. *Immunity* 2004;20(6):707-718. doi:10.1016/j.immuni.2004.05.001.
21. Tokoyoda K, Zehentmeier S, Chang H-D, Radbruch A. Organization and maintenance of immunological memory by stroma niches. *Eur. J. Immunol.* 2009;39(8):2095-2099. doi:10.1002/eji.200939500.
22. Lopes-Carvalho T, Foote J, Kearney JF. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 2005;17(3):244-250. doi:10.1016/j.coi.2005.04.009.
23. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005;105(11):4390-4398. doi:10.1182/blood-2004-11-4284.
24. Caraux A, Klein B, Paiva B, et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and

- CD138+ plasma cells. *Haematologica* 2010;95(6):1016-20. doi:10.3324/haematol.2009.018689.
25. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;132(3):536-44. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.006.
  26. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 1990;11(7):237-44.
  27. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat. Rev. Cancer* 2012;12(5):335-48. doi:10.1038/nrc3257.
  28. Mailankody S, Mena E, Yuan CM, Balakumaran A, Kuehl WM, Landgren O. Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* 2010;51(12):2159-70. doi:10.3109/10428194.2010.525725.
  29. Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood* 2015;125(20):3049-58. doi:10.1182/blood-2014-11-568881.
  30. Chen-Kiang S. Biology of plasma cells. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2005;18(4):493-507. doi:10.1016/j.beha.2005.02.002.
  31. Chesi M, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int. J. Hematol.* 2013;97(3):313-23. doi:10.1007/s12185-013-1291-2.
  32. Romano A, Conticello C, Cavalli M, et al. Immunological dysregulation in multiple myeloma microenvironment. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:198539. doi:10.1155/2014/198539.
  33. Guillerey C, Nakamura K, Vuckovic S, Hill GR, Smyth MJ. Immune responses in multiple myeloma: role of the natural immune surveillance and potential of immunotherapies. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016;73(8):1569-1589. doi:10.1007/s00018-016-2135-z.
  34. Mitsiades CS, McMillin DW, Klippel S, et al. The Role of the Bone Marrow Microenvironment in the Pathophysiology of Myeloma and Its Significance in the Development of More Effective Therapies. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2007;21(6):1007-1034. doi:10.1016/j.hoc.2007.08.007.
  35. Raja KRM, Hajek R. Contribution of regulatory T cells to immunosuppression and

- disease progression in multiple myeloma patients. *Oncoimmunology* 2013;2(9):e25619. doi:10.4161/onci.25619.
36. Rutella S, Locatelli F. Targeting multiple-myeloma-induced immune dysfunction to improve immunotherapy outcomes. *Clin. Dev. Immunol.* 2012;2012:196063. doi:10.1155/2012/196063.
37. Dasanu C a. Immune alterations in untreated and treated multiple myeloma. *J. Oncol. Pharm. Pract.* 2012;18(2):257-63. doi:10.1177/1078155211412842.
38. Kastritis E, Zagouri F, Symeonidis A, et al. Preserved levels of uninvolved immunoglobulins are independently associated with favorable outcome in patients with symptomatic multiple myeloma. *Leukemia* 2014;28(10):2075-2079. doi:10.1038/leu.2014.110.
39. González-Calle V, Cerdá S, Labrador J, et al. Recovery of polyclonal immunoglobulins one year after autologous stem cell transplantation as a long-term predictor marker of progression and survival in multiple myeloma. *Haematologica* 2017;102(5). doi:10.3324/haematol.2016.158345.
40. Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, et al. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia* 2013;27(1):208-12. doi:10.1038/leu.2012.189.
41. Ludwig H, Milosavljevic D, Berlanga O, et al. Suppression of the noninvolved pair of the myeloma isotype correlates with poor survival in newly diagnosed and relapsed/refractory patients with myeloma. *Am. J. Hematol.* 2016;91(3):295-301. doi:10.1002/ajh.24268.
42. Ludwig H, Slavka G, Hübl W, et al. Usage of HLC-Ratio, FLC-Ratio, Ife, PBMC Infiltration and Isotype Suppression At Best Response Reveals Isotype Suppression As Most Powerful Parameter for Identification of Multiple Myeloma Patients with Long Survival. *Blood* 2015;120(21).
43. Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N, et al. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2013;27(1):213-9. doi:10.1038/leu.2012.197.
44. de Larrea CF, Cibeira MT, Elena M, et al. Abnormal serum free light chain ratio in

- patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition. *Blood* 2009;114(24):4954-6. doi:10.1182/blood-2009-06-224832.
45. Katzmann JA, Willrich MA V, Kohlhagen MC, et al. Monitoring IgA multiple myeloma: immunoglobulin heavy/light chain assays. *Clin. Chem.* 2015;61(2):360-7. doi:10.1373/clinchem.2014.231985.
  46. Calderon B. Heavy/Light Chain Assay for Monitoring IgA Multiple Myeloma: Digging Out the IgA from the  $\beta$  Region. *Clin. Chem.* 2015;61(2).
  47. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2011;364(11):1046-60. doi:10.1056/NEJMra1011442.
  48. Vincent Rajkumar S, Kumar S, Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *JMCP* 2016;91(1):101-119. doi:10.1016/j.mayocp.2015.11.007.
  49. Mateos M-V, Hernández M-T, Giraldo P, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(5):438-47. doi:10.1056/NEJMoA1300439.
  50. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet. Oncol.* 2014;15(12):e538-48. doi:10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
  51. Chawla SS, Kumar SK, Dispenzieri A, et al. Clinical course and prognosis of non-secretory multiple myeloma. *Eur. J. Haematol.* 2015;95(1):57-64. doi:10.1111/ejh.12478.
  52. Smith D, Yong K. Advances in understanding prognosis in myeloma. *Br. J. Haematol.* 2016. doi:10.1111/bjh.14304.
  53. Chretien M-L, Hebraud B, Cances-Lauwers V, et al. Age is a prognostic factor even among patients with multiple myeloma younger than 66 years treated with high-dose melphalan: the IFM experience on 2316 patients. *Haematologica* 2014;99(7).
  54. Dimopoulos MA, Terpos E, Chanan-Khan A, et al. Renal Impairment in Patients With Multiple Myeloma: A Consensus Statement on Behalf of the International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2010;28. doi:10.1200/JCO.2010.30.8791.
  55. Sigurdardottir EE, Turesson I, Lund SH, et al. The Role of Diagnosis and Clinical

- Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance on Survival in Multiple Myeloma. *JAMA Oncol.* 2015;1(2):168. doi:10.1001/jamaoncol.2015.23.
56. Moreau P, Facon T, Leleu X, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 2002;100(5).
  57. Paiva B, Vídriales M-B, Montalbán M-Á, et al. Multiparameter flow cytometry evaluation of plasma cell DNA content and proliferation in 595 transplant-eligible patients with myeloma included in the Spanish GEM2000 and GEM2005. *Am. J. Pathol.* 2012;181(5):1870-8. doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.020.
  58. Terpos E, Katodritou E, Roussou M, et al. High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international myeloma staging system even in the era of novel agents. *Eur. J. Haematol.* 2010;85(2):114-9. doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01466.x.
  59. Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2010;78(4):239-52. doi:10.1002/cyto.b.20512.
  60. Rajan AM, Rajkumar S V. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J.* 2015;5(10):e365. doi:10.1038/bcj.2015.92.
  61. Landgren O, Morgan GJ. Biologic Frontiers in Multiple Myeloma: From Biomarker Identification to Clinical Practice. *Clin. Cancer Res.* 2014;20(4).
  62. Fonseca R, Monge J, Dimopoulos MA. Staging and prognostication of multiple myeloma. *Expert Rev. Hematol.* 2014;7(1):21-31. doi:10.1586/17474086.2014.882224.
  63. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975;36(3):842-54.
  64. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, et al. International staging system for multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(15):3412-20. doi:10.1200/JCO.2005.04.242.
  65. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J. Clin. Oncol.* 2015;33(26):2863-9. doi:10.1200/JCO.2015.61.2267.
  66. Kastritis E, Terpos E, Roussou M, et al. Evaluation of the Revised International Staging

- System in an independent cohort of unselected patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2017;102(3).
67. Kumar L, Iqbal N, Mookerjee A, et al. Complete response after autologous stem cell transplant in multiple myeloma. *Cancer Med.* 2014;3(4):939-46. doi:10.1002/cam4.257.
68. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014;123(20):3073-9. doi:10.1182/blood-2014-01-550020.
69. Paiva B, Vidriales M-B, Cerveró J, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 2008;112(10):4017-23. doi:10.1182/blood-2008-05-159624.
70. Bladé J, San Miguel JF, Fontanillas M, et al. Increased conventional chemotherapy does not improve survival in multiple myeloma: long-term results of two PETHEMA trials including 914 patients. *Hematol. J.* 2001;2(4):272-8. doi:10.1038/sj/thj/6200115.
71. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *N. Engl. J. Med.* 1996;335(2):91-7. doi:10.1056/NEJM199607113350204.
72. Bladé J, Rosiñol L, Sureda A, et al. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood* 2005;106(12):3755-9. doi:10.1182/blood-2005-03-1301.
73. Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, Rovira M, Carreras E. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma beyond 2010. *Blood* 2010;115(18):3655-63. doi:10.1182/blood-2009-08-238196.
74. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(10):895-905. doi:10.1056/NEJMoa1402888.
75. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111(5):2516-20. doi:10.1182/blood-2007-

- 10-116129.
76. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia* 2010;24(1):22-32. doi:10.1038/leu.2009.236.
  77. Luptakova K, Rosenblatt J, Glotzbecker B, et al. Lenalidomide enhances anti-myeloma cellular immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* 2013;62(1):39-49. doi:10.1007/s00262-012-1308-3.
  78. Davies FE, Raje N, Hideshima T, et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 2001;98(1):210-6.
  79. Pellom ST, Dudimah DF, Thounaojam MC, Sayers TJ, Shanker A. Modulatory effects of bortezomib on host immune cell functions. *Immunotherapy* 2015;7(9):1011-1022. doi:10.2217/imt.15.66.
  80. Rajkumar SV. Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am. J. Hematol.* 2016;91(1):90-100. doi:10.1002/ajh.24236.
  81. San Miguel J, Weisel K, Moreau P, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* 2013;14(11):1055-66. doi:10.1016/S1470-2045(13)70380-2.
  82. Mateos M-V, Oriol A, Martínez-López J, et al. GEM2005 trial update comparing VMP/VTP as induction in elderly multiple myeloma patients: do we still need alkylators? *Blood* 2014;124(12):1887-93. doi:10.1182/blood-2014-05-573733.
  83. Vincent Rajkumar S. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 2014;89(10):999-1009. doi:10.1002/ajh.23810.
  84. Moreau P, Avet-Loiseau H, Facon T, et al. Bortezomib plus dexamethasone versus reduced-dose bortezomib, thalidomide plus dexamethasone as induction treatment before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2011;118(22):5752-8; quiz 5982. doi:10.1182/blood-2011-05-355081.
  85. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, et al. Lenalidomide and Dexamethasone in Transplant-Ineligible Patients with Myeloma for the FIRST Trial Team\*. *N Engl J Med* 2014;371(4):906-17. doi:10.1056/NEJMoa1402551.



86. Blanes M, Lahuerta JJ, González JD, et al. Intravenous Busulfan and Melphalan as a Conditioning Regimen for Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Matched Comparison to a Melphalan-Only Approach. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2013;19(1):69-74. doi:10.1016/j.bbmt.2012.08.009.
87. Olszewska-Szopa M, Rzepecki P. Consolidation in multiple myeloma - current status and perspectives. *Contemp. Oncol. (Poznan, Poland)* 2014;18(5):313-7. doi:10.5114/wo.2014.45983.
88. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, et al. Lenalidomide Maintenance after Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(19):1782-1791. doi:10.1056/NEJMoa1114138.
89. Wang Y, Sanchez L, Siegel DS, Wang ML. Elotuzumab for the treatment of multiple myeloma. *J. Hematol. Oncol.* 2016;9(1):55. doi:10.1186/s13045-016-0284-z.
90. Collins SM, Bakan CE, Swartzel GD, et al. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer Immunol. Immunother.* 2013;62(12):1841-1849. doi:10.1007/s00262-013-1493-8.
91. Starr P. Elotuzumab, First-in-Class Monoclonal Antibody Immunotherapy, Improves Outcomes in Patients with Multiple Myeloma. *Am. Heal. drug benefits* 2015;8(Spec Issue):17.
92. Laubach JP, Tai Y-T, Richardson PG, Anderson KC. Daratumumab granted breakthrough drug status. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2014;23(4):445-452. doi:10.1517/13543784.2014.889681.
93. Phipps C, Chen Y, Gopalakrishnan S, Tan D. Daratumumab and its potential in the treatment of multiple myeloma: overview of the preclinical and clinical development. *Ther. Adv. Hematol.* 2015;6(3):120-7. doi:10.1177/2040620715572295.
94. San Miguel J, Mateos M-V, Shah JJ, et al. Pembrolizumab in Combination with Lenalidomide and Low-Dose Dexamethasone for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM): Keynote-023. *Blood* 2015;126(23).
95. Ali SA, Shi V, Maric I, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood* 2016;128(13).

96. Naymagon L, Abdul-Hay M. Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future. *J. Hematol. Oncol.* 2016;9(1):52. doi:10.1186/s13045-016-0282-1.
97. Karp Leaf R, Cho HJ, Avigan D. Immunotherapy for Multiple Myeloma, Past, Present, and Future: Monoclonal Antibodies, Vaccines, and Cellular Therapies. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2015;10(4):395-404. doi:10.1007/s11899-015-0283-0.
98. Paiva B, Cedena M-T, Puig N, et al. Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood* 2016;127(25):3165-74. doi:10.1182/blood-2016-03-705319.
99. Lahuerta J-J, Paiva B, Vidriales M-B, et al. Depth of Response in Multiple Myeloma: A Pooled Analysis of Three PETHEMA/GEM Clinical Trials. *J. Clin. Oncol.* 2017;35(25):2900-2910. doi:10.1200/JCO.2016.69.2517.
100. Kumar SK, Rajkumar S V. The current status of minimal residual disease assessment in myeloma. *Leukemia* 2014;28(2):239-40. doi:10.1038/leu.2013.306.
101. Sherrod AM, Hari P, Mosse CA, Walker RC, Cornell RF. Minimal residual disease testing after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2015;51(1):2-12. doi:10.1038/bmt.2015.164.
102. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma. *JAMA Oncol.* 2017;3(1):28. doi:10.1001/jamaoncol.2016.3160.
103. Rawstron AC, Gregory WM, De Tute RM, et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood* 2015;125(12):1932-5. doi:10.1182/blood-2014-07-590166.
104. Paiva B, van Dongen JJM, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood* 2015;125(20):3059-68. doi:10.1182/blood-2014-11-568907.
105. Paiva B, Puig N, Garcia-Sanz R, San Miguel JF. Is This the Time to Introduce Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma Clinical Practice? *Clin. Cancer Res.* 2015;21(9):2001-2008. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2841.
106. Nishihori T, Song J, Shain KH. Minimal Residual Disease Assessment in the Context of

- Multiple Myeloma Treatment. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2016;11(2):118-26. doi:10.1007/s11899-016-0308-3.
107. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(20):2540-7. doi:10.1200/JCO.2012.46.2119.
108. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93(3):431-438. doi:10.3324/haematol.11080.
109. Arroz M, Came N, Lin P, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* 2016;90(1):31-39. doi:10.1002/cyto.b.21228.
110. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2015;90(1):26-30. doi:10.1002/cyto.b.21249.
111. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017. doi:10.1038/leu.2017.29.
112. Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia* 2014;28(2):391-397. doi:10.1038/leu.2013.217.
113. Mishima Y, Paiva B, Shi J, et al. Mutational Profile and Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Multiple Myeloma. *Blood* 2015;126(23).
114. Mishima Y, Paiva B, Shi J, et al. The Mutational Landscape of Circulating Tumor Cells in Multiple Myeloma. *Cell Rep.* 2017;19(1):218-224. doi:10.1016/j.celrep.2017.03.025.
115. Innao V, Allegra A, Russo S, et al. Standardisation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Eur. J. Cancer Care (Engl)*. 2017:e12732. doi:10.1111/ecc.12732.
116. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2016;17(8):e328-e346. doi:10.1016/S1470-2045(16)30206-6.

117. Bladé J, Samson D, Reece D, et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br. J. Haematol.* 1998;102(5):1115-23.
118. Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20(9):1467-73. doi:10.1038/sj.leu.2404284.
119. Alhaj Moustafa M, Rajkumar S V, Dispenzieri A, et al. Utility of serum free light chain measurements in multiple myeloma patients not achieving complete response to therapy. *Leukemia* 2015;29(10):2033-8. doi:10.1038/leu.2015.118.
120. Martínez-López J, Paiva B, López-Anglada L, et al. Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality. *Blood* 2015;126(7):858-62. doi:10.1182/blood-2015-04-638742.
121. Fujisawa M, Seike K, Fukumoto K, et al. oligoclonal bands in patients with multiple myeloma: its emergence per se could not be translated to improved survival. *Cancer Sci.* 2014;105(11):1442-6. doi:10.1111/cas.12527.
122. Paiva B, Chandia M, Puig N, et al. The prognostic value of multiparameter flow cytometry minimal residual disease assessment in relapsed multiple myeloma. *Haematologica* 2015;100(2):e53-5. doi:10.3324/haematol.2014.115162.
123. Fukumoto K, Fujisawa M, Suehara Y, et al. Prognostic impact of immunophenotypic complete response in patients with multiple myeloma achieving better than complete response. *Leuk. Lymphoma* 2016;57(8):1786-1792. doi:10.3109/10428194.2015.1121262.
124. Rajkumar SV, Harousseau J-L, Durie B, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 2011;117(18):4691-5. doi:10.1182/blood-2010-10-299487.
125. Porrata LF, Gertz MA, Inwards DJ, et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001;98(3):579-85.
126. Jimenez-Zepeda VH, Reece DE, Trudel S, et al. Absolute Lymphocyte Count as Predictor of Overall survival for Patients with Multiple Myeloma Treated with Single Autologous Stem Cell Transplant. *Leuk. Lymphoma* 2014;56(9):2668-2673.

- doi:10.3109/10428194.2014.1003057.
127. Kim H, Sohn H-J, Kim S, Lee J-S, Kim W-K, Suh C. Early lymphocyte recovery predicts longer survival after autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(11):1037-1042. doi:10.1038/sj.bmt.1705373.
  128. Porrata LF, Litzow MR, Markovic SN. Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Mayo Clin. Proc.* 2001;76(4):407-12. doi:10.4065/76.4.407.
  129. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1998;92(5):1471-90.
  130. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi J V, Champlin RE, Saxon A. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant.* 1993;12(4):387-98.
  131. Rutella S, Pierelli L, Sica S, Rumi C, Leone G. Transplantation of Autologous Peripheral Blood Progenitor Cells: Impact of CD34-Cell Selection on Immunological Reconstitution. *Leuk. Lymphoma* 2001;42(6):1207-1220. doi:10.3109/10428190109097745.
  132. Nordøy T, Kolstad A, Endresen P, et al. Persistent changes in the immune system 4–10 years after ABMT. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24(8):873-878. doi:10.1038/sj.bmt.1702006.
  133. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J. Clin. Invest.* 2005;115(4):930-9. doi:10.1172/JCI22492.
  134. Williams KM, Gress RE. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2008;21(3):579-96. doi:10.1016/j.beha.2008.06.003.
  135. Dosani T, Carlsten M, Maric I, Landgren O. The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of MM and their uses in immunotherapies. *Blood Cancer J.* 2015;5(4):e306. doi:10.1038/bcj.2015.32.
  136. Zamarin D, Giralto S, Landau H, et al. Patterns of relapse and progression in multiple

- myeloma patients after auto-SCT: implications for patients' monitoring after transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(3):419-24. doi:10.1038/bmt.2012.151.
137. Fernández de Larrea C, Jiménez R, Rosiñol L, et al. Pattern of relapse and progression after autologous SCT as upfront treatment for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(2):223-7. doi:10.1038/bmt.2013.150.
  138. Ege H, Gertz MA, Svetomir N, et al. Prediction of survival using absolute lymphocyte count for newly diagnosed patients with multiple myeloma: a retrospective study. 2008;(April):792-798. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07123.x.
  139. Dosani T, Covut F, Beck R, Driscoll JJ, de Lima M, Malek E. Significance of the absolute lymphocyte/monocyte ratio as a prognostic immune biomarker in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e579. doi:10.1038/bcj.2017.60.
  140. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2003;9(2):606-12.
  141. Muthu Raja KR, Rihova L, Zahradova L, Klincova M, Penka M, Hajek R. Increased T regulatory cells are associated with adverse clinical features and predict progression in multiple myeloma. *PLoS One* 2012;7(10):e47077. doi:10.1371/journal.pone.0047077.
  142. Bryant C, Suen H, Brown R, et al. Long-term survival in multiple myeloma is associated with a distinct immunological profile, which includes proliferative cytotoxic T-cell clones and a favourable Treg/Th17 balance. *Blood Cancer J.* 2013;3(9):e148. doi:10.1038/bcj.2013.34.
  143. Kay NE, Leong TL, Bone N, et al. Blood levels of immune cells predict survival in myeloma patients: results of an Eastern Cooperative Oncology Group phase 3 trial for newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood* 2001;98(1):23-8.
  144. Koike M, Sekigawa I, Okada M, et al. Relationship between CD4(+)/CD8(+) T cell ratio and T cell activation in multiple myeloma: reference to IL-16. *Leuk. Res.* 2002;26(8):705-11.
  145. Tovar N, Fernández de Larrea C, Elena M, et al. Prognostic Impact of Serum Immunoglobulin Heavy/Light Chain Ratio in Patients with Multiple Myeloma in Complete Remission after Autologous Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow*

- Transplant.* 2014;18(7):1076-9. doi:10.1016/j.bbmt.2012.03.004.
146. Espiño M, Medina S, Blanchard MJ, Villar LM. Involved/uninvolved immunoglobulin ratio identifies monoclonal gammopathy of undetermined significance patients at high risk of progression to multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2014;164(5):752-755. doi:10.1111/bjh.12679.
  147. Graziani MS, Merlini G. Serum free light chain analysis in the diagnosis and management of multiple myeloma and related conditions. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014;14(1):55-66. doi:10.1586/14737159.2014.864557.
  148. Özkurt ZN, Sucak GT, Akı ŞZ, Yağcı M, Haznedar R. Early Prognostic Value of Monitoring Serum Free Light Chain in Patients with Multiple Myeloma Undergoing Autologous Stem Cell Transplantation. *Cancer Invest.* 2017;1-7. doi:10.1080/07357907.2016.1270958.
  149. Thomas Dejoie , Michel Attal , Philippe Moreau HA-L. SERUM FLC MEASUREMENTS COMPLEMENT BONE MARROW ASSESSMENT TO.... EHA Learning Center. Dejoie T. Jun 23 2017; 181635. *EHA Learn. Center. Dejoie T. Jun 23, 2017; 181635* 2017. Available at: <https://learningcenter.ehaweb.org/eha/2017/22nd/181635/thomas.dejoie.serum.flc.measurements.complement.bone.marrow.assessment.to.html>. Accessed June 26, 2017.
  150. Wu P, Walker BA, Broyl A, et al. A gene expression based predictor for high risk myeloma treated with intensive therapy and autologous stem cell rescue. *Leuk. Lymphoma* 2015;56(3):594-601. doi:10.3109/10428194.2014.911863.
  151. Xiang T, Hu A-X, Sun P, Liu G, Liu G, Xiao Y. Identification of four potential predicting miRNA biomarkers for multiple myeloma from published datasets. *PeerJ* 2017;5:e2831. doi:10.7717/peerj.2831.
  152. Rocci A, Hofmeister CC, Pichiorri F. The potential of miRNAs as biomarkers for multiple myeloma. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014;14(8):947-959. doi:10.1586/14737159.2014.946906.
  153. Dimopoulos MA, Hillengass J, Usmani S, et al. Role of Magnetic Resonance Imaging in the Management of Patients With Multiple Myeloma: A Consensus Statement. *J. Clin. Oncol.* 2015;33(6):657-664. doi:10.1200/JCO.2014.57.9961.
  154. Turesson I, Velez R, Kristinsson SY, Landgren O. Patterns of improved survival in

- patients with multiple myeloma in the twenty-first century: a population-based study. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(5):830-4. doi:10.1200/JCO.2009.25.4177.
155. Ludwig H, Bolejack V, Crowley J, et al. Survival and years of life lost in different age cohorts of patients with multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(9):1599-605. doi:10.1200/JCO.2009.25.2114.
156. Rajkumar SV. Treatment of myeloma: cure vs control. *Mayo Clin. Proc.* 2008;83(10):1142-5. doi:10.4065/83.10.1142.
157. Bensinger WI, Maloney D, Storb R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for multiple myeloma. *Semin. Hematol.* 2001;38(3):243-9.
158. Lokhorst HM, Schattenberg A, Cornelissen JJ, et al. Donor lymphocyte infusions for relapsed multiple myeloma after allogeneic stem-cell transplantation: predictive factors for response and long-term outcome. *J. Clin. Oncol.* 2000;18(16):3031-7.
159. Rueff J, Medinger M, Heim D, Passweg J, Stern M. Lymphocyte Subset Recovery and Outcome after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Plasma Cell Myeloma. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014;20(6):896-899. doi:10.1016/j.bbmt.2014.03.007.
160. Porrata LF, Gertz MA, Geyer SM, et al. The dose of infused lymphocytes in the autograft directly correlates with clinical outcome after autologous peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Leukemia* 2004;18(6):1085-1092. doi:10.1038/sj.leu.2403341.
161. Pessoa de Magalhães RJ, Vidriales M-B, Paiva B, et al. Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica* 2013;98(1):79-86. doi:10.3324/haematol.2012.067272.
162. Goodyear O, Piper K, Khan N, et al. CD8+ T cells specific for cancer germline gene antigens are found in many patients with multiple myeloma, and their frequency correlates with disease burden. *Blood* 2005;106(13):4217-24. doi:10.1182/blood-2005-02-0563.
163. Michalek J, Ocadlikova D, Matejkova E, et al. Individual myeloma-specific T-cell clones eliminate tumour cells and correlate with clinical outcomes in patients with multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2010;148(6):859-867. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08034.x.



164. Sugita K, Soiffer RJ, Murray C, Schlossman SF, Ritz J, Morimoto C. The phenotype and reconstitution of immunoregulatory T cell subsets after T cell-depleted allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994;57(10):1465-73.
165. Bengtsson M, Tötterman TH, Smedmyr B, Festin R, Oberg G, Simonsson B. Regeneration of functional and activated NK and T sub-subset cells in the marrow and blood after autologous bone marrow transplantation: a prospective phenotypic study with 2/3-color FACS analysis. *Leukemia* 1989;3(1):68-75.
166. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Age, Thymopoiesis, and CD4+ T-Lymphocyte Regeneration after Intensive Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 1995;332(3):143-149. doi:10.1056/NEJM199501193320303.
167. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet (London, England)* 2000;355(9218):1875-81. doi:10.1016/S0140-6736(00)02293-5.
168. Svaldi M, Lanthaler AJ, Dugas M, et al. T-cell receptor excision circles: a novel prognostic parameter for the outcome of transplantation in multiple myeloma patients. *Br. J. Haematol.* 2003;122(5):795-801.
169. Feyler S, von Lilienfeld-Toal M, Jarmin S, et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+)CD4(-)CD8(-)alphabetaTCR(+) Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden. *Br. J. Haematol.* 2009;144(5):686-95. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07530.x.
170. Chung DJ, Pronschinske KB, Shyer JA, et al. T-cell Exhaustion in Multiple Myeloma Relapse after Autotransplant: Optimal Timing of Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* 2016;4(1).
171. Kansagra A, Inwards DJ, Ansell SM, et al. Infusion of autograft natural killer cell/CD14+HLA-DRDIM cell ratio predicts survival in lymphoma post autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2017. doi:10.1038/bmt.2017.225.
172. Stabile H, Fionda C, Gismondi A, Santoni A. Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response. *Front. Immunol.* 2017;8:293. doi:10.3389/fimmu.2017.00293.
173. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D,

- and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* 2007;67(18):8444-9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4230.
174. Meehan KR, Talebian L, Tosteson TD, et al. Adoptive cellular therapy using cells enriched for NKG2D+CD3+CD8+T cells after autologous transplantation for myeloma. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2013;19(1):129-37. doi:10.1016/j.bbmt.2012.08.018.
175. Stringaris K, Sekine T, Khoder A, et al. Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2014;99(5):836-847. doi:10.3324/haematol.2013.087536.
176. Morice WG. The immunophenotypic attributes of NK cells and NK-cell lineage lymphoproliferative disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007;127(6):881-6. doi:10.1309/Q49CRJ030L22MHLF.
177. Maasho K, Opoku-Anane J, Marusina AI, Coligan JE, Borrego F. Cutting Edge: NKG2D Is a Costimulatory Receptor for Human Naive CD8+ T Cells. *J. Immunol.* 2005;174(8):4480-4484. doi:10.4049/jimmunol.174.8.4480.
178. Talebian L, Fischer DA, Wu J, et al. The natural killer-activating receptor, NKG2D, on CD3+CD8+ T cells plays a critical role in identifying and killing autologous myeloma cells. *Transfusion* 2014;54(6):1515-21. doi:10.1111/trf.12517.
179. Kocoglu M, Badros A. The Role of Immunotherapy in Multiple Myeloma. *Pharmaceuticals* 2016;9(1):3. doi:10.3390/ph9010003.
180. Giuliani M, Janji B, Berchem G. Activation of NK cells and disruption of PD-L1/PD-1 axis: two different ways for lenalidomide to block myeloma progression. *Oncotarget* 2015;8(14):24031-24044. doi:10.18632/oncotarget.15234.
181. Lonial S, Vij R, Harousseau J-LJ-L, et al. Elotuzumab in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(16):1953-9. doi:10.1200/JCO.2011.37.2649.
182. van der Veer MS, de Weers M, van Kessel B, et al. Towards effective immunotherapy of myeloma: enhanced elimination of myeloma cells by combination of lenalidomide with the human CD38 monoclonal antibody daratumumab. *Haematologica* 2011;96(2):284-290. doi:10.3324/haematol.2010.030759.
183. Rosenblatt J, Avigan D, Israel B. Targeting the PD-1/PD-L1 axis in multiple myeloma: a

- dream or a reality. *Blood* 2016;1-10. doi:10.1182/blood-2016-08-731885.
184. Giuliani M, Janji B, Berchem G. Activation of NK cells and disruption of PD-L1/PD-1 axis: two different ways for lenalidomide to block myeloma progression. *Oncotarget* 2015. doi:10.18632/oncotarget.15234.
185. Koulieris E, Panayiotidis P, Harding SJ, et al. Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by Hevylite™ assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma. *Exp. Hematol. Oncol.* 2012;1(1):9. doi:10.1186/2162-3619-1-9.
186. Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, de Larrea CF. Pathogenesis and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* 2008;22(9):1651-1657. doi:10.1038/leu.2008.203.
187. Anderson KC, Auclair D, Kelloff GJ, et al. The Role of Minimal Residual Disease Testing in Myeloma Treatment Selection and Drug Development: Current Value and Future Applications. *Clin. Cancer Res.* 2017;clincanres.2895.2016. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2895.
188. Paiva B, Pérez-Andrés M, Vídriales M-B, et al. Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS vs myeloma. *Leukemia* 2011;25(4):697-706. doi:10.1038/leu.2010.320.

## ***PUBLICACIONES***

## ORIGINAL ARTICLE

# Multiple myeloma patients in long-term complete response after autologous stem cell transplantation express a particular immune signature with potential prognostic implication

A Artech-López<sup>1</sup>, A Kreutzman<sup>2</sup>, A Alegre<sup>3</sup>, P Sanz Martín<sup>1</sup>, B Aguado<sup>3</sup>, M González-Pardo<sup>3</sup>, M Espiño<sup>4</sup>, LM Villar<sup>4</sup>, D García Belmonte<sup>5</sup>, R de la Cámara<sup>5</sup> and C Muñoz-Calleja<sup>2</sup>

The proportion of multiple myeloma patients in long-term complete response (LTCR-MM) for more than 6 years after autologous stem cell transplantation (ASCT) is small. To evaluate whether this LTCR is associated with a particular immune signature, peripheral blood samples from 13 LTCR-MM after ASCT and healthy blood donors (HBD) were analysed. Subpopulations of T-cells (naïve, effector, central memory and regulatory), B-cells (naïve, marginal zone-like, class-switched memory, transitional and plasmablasts) and NK-cells expressing inhibitory and activating receptors were quantified by multiparametric flow cytometry (MFC). Heavy/light chains (HLC) were quantified by nephelometry. The percentage of CD4<sup>+</sup> T-cells was lower in patients, whereas an increment in the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector memory T-cells was associated with the LTCR. Regulatory T-cells and NK-cells were similar in both groups but a particular redistribution of inhibitory and activating receptors in NK-cells were found in patients. Regarding B-cells, an increase in naïve cells and a corresponding reduction in marginal zone-like and class-switched memory B-cells was observed. The HLC values were normal. Our results suggest that LTCR-MM patients express a particular immune signature, which probably reflects a 'high quality' immune reconstitution that could exert a competent anti-tumor immunological surveillance along with a recovery of the humoral immunity.

*Bone Marrow Transplantation* advance online publication, 3 April 2017; doi:10.1038/bmt.2017.29

## INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a biologically heterogeneous disease with great variability among patients in terms of response to therapy and overall survival (OS). In the last decade, several novel agents such as immunomodulators (thalidomide, lenalidomide and pomalidomide) and proteasome inhibitors (bortezomib and carfilzomib) have been approved for the treatment of MM.<sup>1–4</sup> With these new drugs and the introduction of high-dose therapy followed by autologous stem cell transplantation (HDT/ASCT) in eligible patients, the response rates and OS have significantly improved, changing life expectancy of MM patients.<sup>1,5–7</sup>

It is well documented that achieving a complete response (CR) after HDT/ASCT is associated with a longer survival, thus making CR the most important prognostic factor in this setting.<sup>1,8–11</sup> However, the spectrum of long-term outcomes in patients who achieve CR is heterogeneous, including patients who will lose their CR status during the first year and few patients who will remain in sustained CR for more than 10 years, who may be considered as potentially cured.<sup>12</sup> The identification of these patients is crucial, but little is known about other characteristics apart from the persistence of a negative minimal residual disease (MRD) that could predict a sustained CR.<sup>13–17</sup> Interestingly, several studies revealed that the absolute lymphocyte count recovery is associated with a longer OS in MM,<sup>18,19</sup> suggesting that immune reconstitution after HDT/ASCT determines the duration of the relapse free period. As a matter of fact, many qualitative and

quantitative alterations of different immune parameters have been described in MM patients.<sup>20,21</sup> Among others, there is an expansion of cytotoxic lymphocytes that could partially control the progression of the disease,<sup>22,23</sup> but the tumoral cells will eventually escape their control in probable relationship to a marked immunosuppressive microenvironment, as supported by the reported increased in regulatory T-cells (Tregs) and the Treg/Th17 ratio in relapsed MM patients.<sup>24,25</sup>

The 'Heavy/Light Chain' (HLC) nephelometric/turbidimetric assay accurately quantifies the specific pairs of each HLC of the involved and uninvolved immunoglobulin (Ig) in the serum (IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ), enabling the calculation of the monoclonal/polyclonal Ig ratios (HLC ratios). This test specifically allows the quantification of the tumoral Ig of the patient and, even more interesting, evaluates the immunoparesis in terms of suppression of the specific pair of the uninvolved Ig of the same isotype of the tumor.<sup>26–28</sup>

Even though the quantitative recovery of lymphocytes may play a critical role in the prognosis of MM patients, it is not yet known whether LTCR-MM patients after HDT/ASCT are characterized by a particular immune signature reflecting the recovery of an efficient anti-tumor surveillance.

Our aim was therefore to correlate different parameters of immune reconstitution, including the HLC and the quantification of different lymphoid subpopulations, with the achievement of LTCR following HDT/ASCT in MM patients.

<sup>1</sup>Department of Clinical Analysis, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, University Hospital La Princesa, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Department of Immunology, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, University Hospital La Princesa, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Department of Hematology, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, University Hospital La Princesa, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Department of Immunology, University Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain and <sup>5</sup>Department of Hematology, University Hospital La Zarzuela, Madrid, Spain. Correspondence: Dr C Muñoz-Calleja, Immunology Department, University Hospital La Princesa, C/Diego de León 62, Madrid 28006, Spain. E-mail: [cmunozc@salud.madrid.org](mailto:cmunozc@salud.madrid.org)

Received 1 August 2016; revised 10 January 2017; accepted 20 January 2017

## MATERIALS AND METHODS

### Study patients and samples

The study included a total of 13 LTRC-MM patients (7 males and 6 females; median age: 61) after HDT/ASCT and 15 voluntary and altruist age-matched healthy blood donors (HBD) as control arm. The patients were in LTRC for more than 6 years and less than 19 years after ASCT. Samples were collected randomly at different times, but minimum 6 years after ASCT. The specific time point when samples were acquired for analysis is indicated in Table 1. In order to confirm their specific immune signature, the analysis was repeated in the same LTRC-MM patients 1 year after the first analysis was done. All patients were treated since diagnosis at the Haematology Department of the University Hospital La Princesa in Madrid (Spain) during the years 1995–2009. Patients and HBDs signed an informed consent form according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local ethical committee.

### Analysis of the immunophenotype and the minimal residual disease by multiparametric flow cytometry

EDTA-anticoagulated fresh peripheral blood (PB) and a serum tube were obtained from each subject. Serum was immediately separated by centrifugation (20 min at 2000 g), aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Erythrocyte-lysed whole PB samples were immunophenotyped with an immunofluorescence stain-and-then-lyse technique, using a comprehensive 8-color flow cytometry panel within the 24 h after the samples were obtained. The monoclonal antibody (mAb) combinations for T-, B-, Treg and NK-cells subsets in PB are shown in Table 2. Following the consensus guidelines, the presence of minimal residual disease (MRD) was studied in the bone marrow (BM) of patients by 8 color MFC<sup>29</sup> with the Ab combination showed in Table 2.

The data acquisition was performed in a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences (BD), San Jose, CA, USA) using the FACSDiva software (version 6.1). For the PB phenotyping, 100 000 events were acquired from tubes T, B and NK, and 1 000 000 from Treg tube. To study MRD in the BM, 5000 plasmatic cells (PCs) were analysed from each tube.

The following maturation-associated CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> B-cell subsets were identified: naïve B-cells (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), class-switched memory B-cells (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>), marginal zone-like B-cells (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), transitional (CD27<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) and plasmablasts (CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>). In relation to CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells, the following subsets were identified: naïve T-cells (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), central memory T-cells (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) and effector memory T-cells (CD27<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+/+</sup>). NK and Treg cells were defined as CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup>, respectively.

The comprehensive flow cytometry strategy to identify the different lymphoid subsets is shown in the Supplementary Figure 1.

### Heavy/light chain (HLC) assay and serum parameters

Each serum sample was tested for total Ig concentrations by immunonephelometry (Image800, Beckman Coulter, CA, USA) and, depending on the isotype, the corresponding HLC concentration (that is, IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ or IgMκ, IgMλ) was quantified by immunonephelometry using Hevylite reagents in a Binding Site SPA<sub>PLUS</sub> Analyser provided by the manufacturer (The Binding Site, Birmingham, UK). HLC ratios were determined for each isotype (IgGκ/IgGλ, IgAκ/IgAλ, IgMκ/IgMλ).

Immunoparesis was defined as a reduction below the lower normal limit in the levels of 1 or 2 of the uninvolved Igs<sup>30</sup> (for example, in a MM IgG patient, a reduction of >25% of the lower normal reference range of IgA and/or IgM concentrations). Conventional parameters such as beta-2-microglobulin, FLC ratios, creatinine, calcium, total protein, albumin and haemoglobin were also assessed by standard techniques. Immunoelectrophoresis and immunofixation were run on Sebia Hdrasys (Sebia, Evry, France).

### Statistics

Quantitative variables are expressed as measures of central tendency (mean) and dispersion (s.d.) and were analyzed using the Kruskal–Wallis test for heteroscedasticity variances to evaluate differences among the studied groups. A posteriori test was carried out to compare the control group with the two patient's group (patients and patients +1 year), independently of each other. A Wilcoxon-matched test was used to compare a patient under group 'patients' with the status of the same patient in the second group 'patients +1 year'. Significance was set at a value of  $P \leq 0.05$  (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 5.0; GraphPad, La Jolla, CA, USA).

## RESULTS

### Patient characteristics

Patient characteristics and therapy details are summarized in Table 1. All patients included in this study were in stringent complete response (sCR) for at least 6 years according to the International Myeloma Working Group (IMWG) criteria<sup>31</sup> and had no evidence of autoimmune disease. Furthermore, the percentage and phenotype of PC in the BM was studied by MFC. Supporting a sCR, all of the patients but two whose BM were not available, had less than 1.5% of PC and were MRD-negative at a sensitivity level of  $10^{-4}$  up to  $10^{-5}$  (Table 3).

The median follow-up in sCR in this study was 8 years (range 6–19). The response before ASCT was also evaluated according to the

**Table 1.** Patients characteristics

N°	Age	Gender	MM type	Time after ASCT (years)	Pre-ASCT response	Cytogenetics	b-2M (mg/dL)	Stage (DS/ISS)	Induction treatment	Conditioning
1	43	M	BJ κ	6	VGPR	FISH: t(11;14), t(4;14), t(14;16)	Normal	IIB/2	VAD	Mel 200
2	61	F	BJ λ	7	PR	Normal	Normal	IIA/1	VAD/VBCMP	BuMel
3	64	F	IgG κ	8	CR	NA	High (5,33)	IIA/2	VBCMP/VBAD	Mel 140
4	71	M	IgG κ	11	VGPR	NA	Normal	IIIA/3	RT+VBCMP/VBAD	Mel 200
5	61	M	IgG κ	13	VGPR	Trisomy 11	High (2,61)	IIIA/3	RT+VAD	BuMel
6	51	M	IgG κ	6	VGPR	NA	Normal	IIA/2	TD	Mel 200
7	53	F	IgG κ	7	CR	NA	Normal	IIA/1	TVD	Mel 200
8	60	M	IgG κ	19	CR	NA	Normal	IIIB/1	VAD	BuMel
9	67	F	IgG κ	19	PR	NA	Normal	IIIA/1	VAD/VCAD	BuMel
10	70	M	IgG κ	16	VGPR	NA	High (16)	IIIA/3	RT/VAD	BuMel
11	60	F	BJ λ	15	CR	Normal	Normal	IIIA/1	VAD	BuMel
12	59	M	IgA λ	8	CR	Normal karyotype	Normal	IIA/1	RT/VAD	Mel 200
13	64	F	IgG κ	8	CR	FISH:13q14, 17p13, 14q32	High (5,33)	IIA/2	VBCMP-VBAD	Mel 140

Abbreviations: ASCT=autologous stem cell transplantation; b-2M=beta-2-microglobulin; Bu=busulphan; CR=complete response; F=female; M=male; Mel=melphalan; NA=not available; PR=partial response; RT=radiotherapy; TD=thalidomide-dexamethasone; TVD=thalidomide-vincristine-dexamethasone; VAD=vincristine-doxorubicin-dexamethasone; VBAD=vincristine-carmustine-doxorubicin-dexamethasone; VBCMP=vincristine-carmustine-melphalan-cyclophosphamide-prednisone; VCAD=vincristine-cyclophosphamide-adriamycin-desamethasone; VGPR=very good partial response.

**Table 2.** Antibody panel used in the phenotyping of peripheral blood T, B, and NK-cell subsets, and for the detection of minimal residual disease in the bone marrow

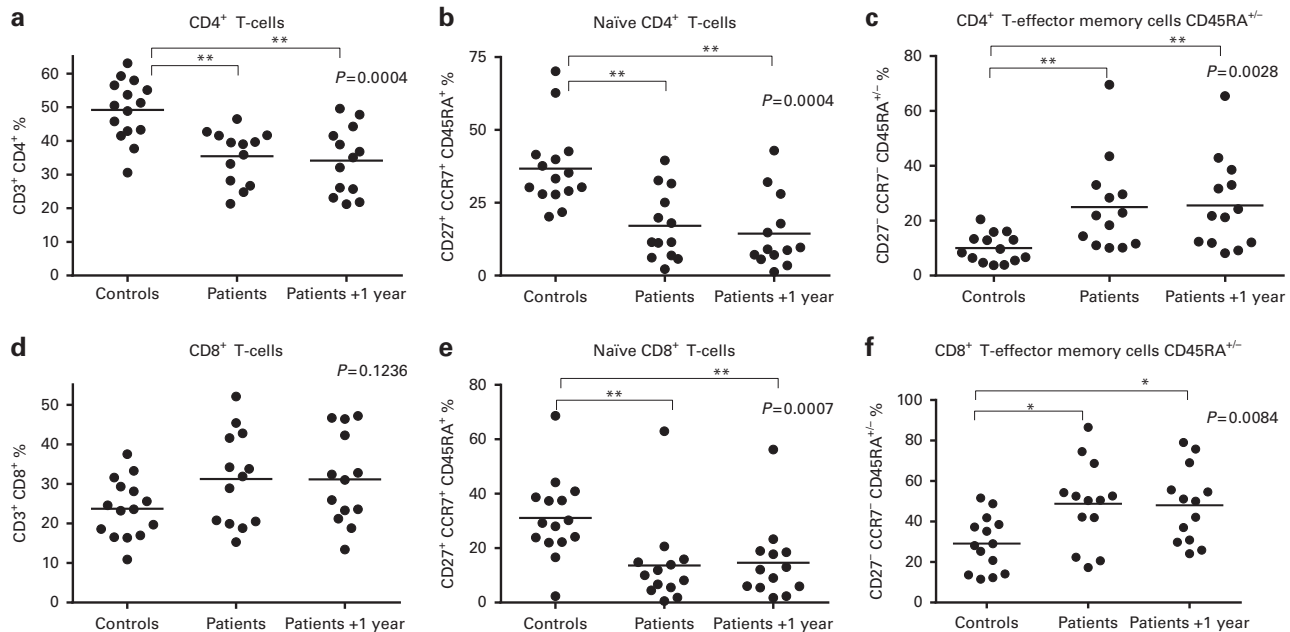
	Tube	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7	PB
PB	Tube T	CD45RA	CCR7	CD3	—	CD27	CD8	CD4
	Tube B	IgD	CD27	CD38	CD19	IgM	CD10	CD20
	Tube NK	NKG2C	NKp46	CD3	NKG2D	NKG2A	CD8	CD56
	Tube NK	DNAM-1	KIR2DL1/S1	KIR2DL1	CD3	KIR2DL4	CD8	CD56
	Tube Treg				CD25	CD127	CD3	CD4
BM	Tube 1	CD38	CD56	CD45	CD19	CD138	CD81	
	Tube 2	CD38	CD28/CD117	CD45	CD19	CD138	CD27	

Abbreviations: BM = bone marrow; PB = peripheral blood.

**Table 3.** Clinical characteristics that supports the stage of stringent complete response according to the IMWG criteria

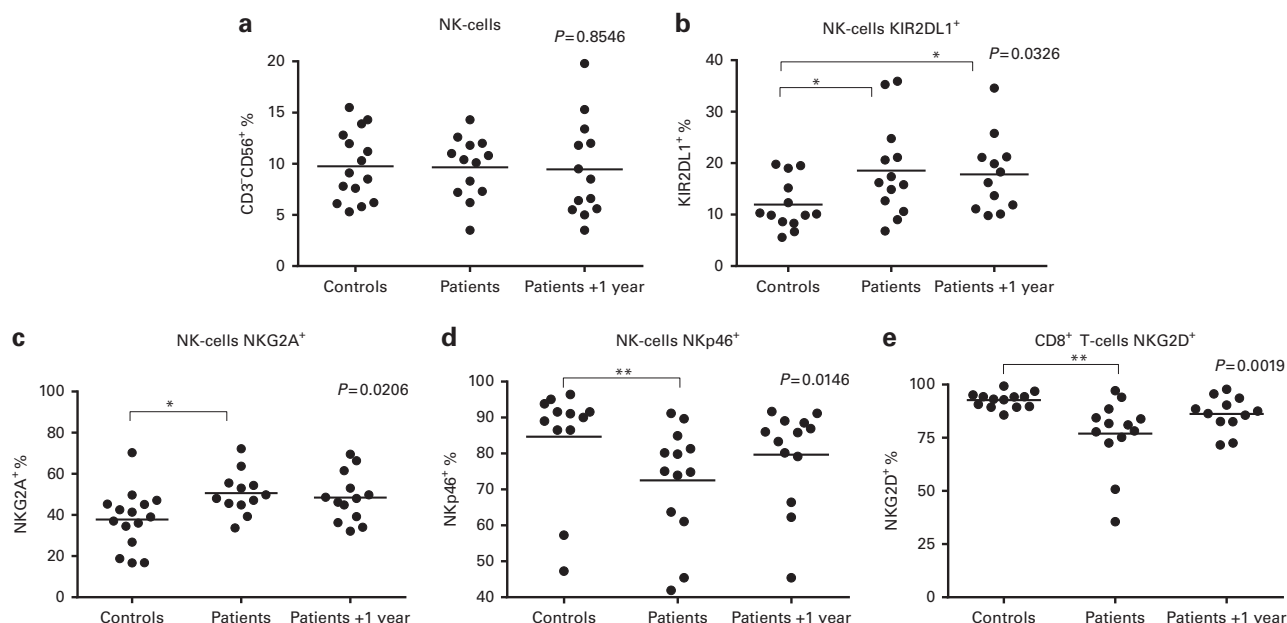
N°	Isotype	EEF	IF in serum/urine	FLC ratio (0.25-1.66)	Cytology: %PC in BM	MFC: %PC in BM	PC's IP	MRD by MFC
1	BJ κ	Normal	Polyclonal/negative	1,02	No observed	0,10%	Normal	Negative
2	BJ λ	Normal	Polyclonal/negative	0,61	2%	0,40%	Normal	Negative
3	IgG κ	Normal	Polyclonal/negative	0,97	NA	NA	NA	NA
4	IgG κ	Normal	Polyclonal/negative	0,65	3%	1,30%	Normal	Negative
5	IgG κ	Normal	Polyclonal/negative	1,15	2%	0,80%	Normal	Negative
6	IgG κ	Normal	Polyclonal/negative	0,53	2%	0,30%	Normal	Negative
7	IgG κ	Normal	Polyclonal/negative	1,13	2%	0,30%	Normal	Negative
8	IgG κ	Normal	Polyclonal/negative	0,81	4%	0,60%	Normal	Negative
9	IgG κ	Normal	Polyclonal/negative	0,72	2%	0,80%	Normal	Negative
10	IgG κ	Normal	Polyclonal/negative	0,83	1%	0,50%	Normal	Negative
11	BJ λ	Normal	Polyclonal/negative	0,88	NA	0,10%	Normal	Negative
12	IgA λ	Normal	Polyclonal/negative	0,48	NA	NA	NA	NA
13	IgG κ	Normal	Polyclonal/negative	0,97	2%	0,25%	Normal	Negative

Abbreviations: BM = bone marrow; EEF = electrophoresis; FLC = free light chains; IF = immunofixation; IP = immunophenotype; MFC = multiparametric flow cytometry; MRD = minimal residual disease; NA = not available; PC = plasma cells.

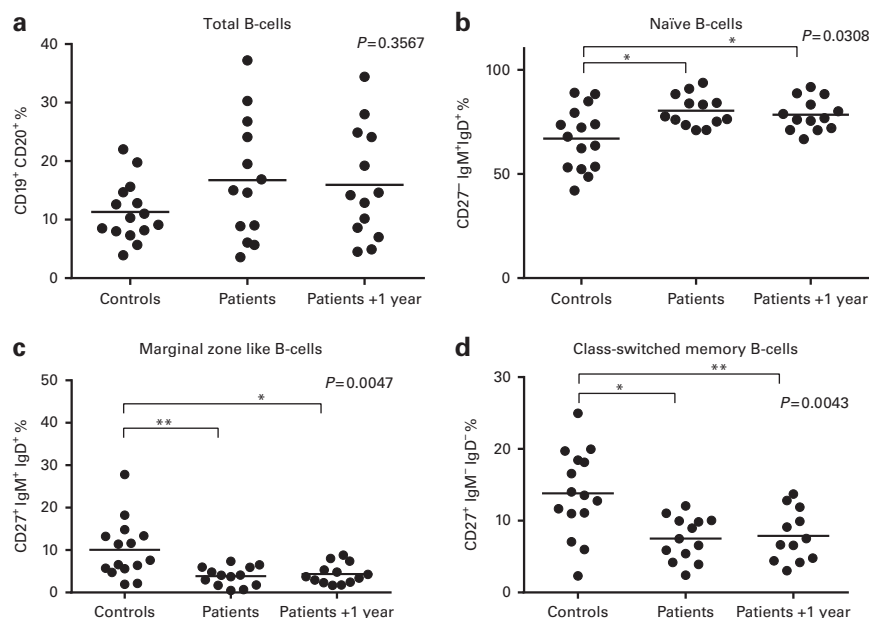


**Figure 1.** Distribution of CD4<sup>+</sup> T-cells and CD8<sup>+</sup> T-cells subsets in peripheral blood from LTRC-MM patients ( $n=13$ ) and age-matched healthy adults ( $n=15$ ). The proportions of (a) CD4<sup>+</sup> T-cells from total lymphocytes, (b) CD4<sup>+</sup> naïve T-cells (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) from total CD4<sup>+</sup> T-cells, (c) CD4<sup>+</sup> effector memory T-cells (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> and CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) from total CD4<sup>+</sup> T-cells. The proportion of (d) CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes from total lymphocytes, (e) CD8<sup>+</sup> naïve T-cells (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) from total CD8<sup>+</sup> T-cells, (f) CD8<sup>+</sup> effector memory T-cells (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> and CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) from total CD8<sup>+</sup> T-cells. 'P' value refers to the Kruskal-Wallis test results and the '\*' to the *a posteriori* test (only statistical differences are marked with \* if  $P < 0.05$  or with \*\* if  $P < 0.01$ ). Scales vary depending on the subpopulation analysed.





**Figure 2.** Expression of activating and inhibitory receptors in NK-cells in the peripheral blood from LTRC-MM patients ( $n=13$ ) and age-matched healthy adults ( $n=15$ ). (a) The proportion of NK-cells (defined as  $CD3^+CD56^+$ ) from total lymphocytes, and expression in NK-cells of (b)  $KIR2DL1^+$ , (c)  $NKG2A^+$  and (d)  $NKP46^+$  are shown. (e) Expression of  $NKG2D^+$  in  $CD8^+$  T-cells. 'P' value refers to the Kruskal-Wallis test results and the '\*' to the *a posteriori* test (only statistical differences are marked with \* if  $P < 0.05$  or with \*\* if  $P < 0.01$ ). Scales vary depending on the subpopulation analysed.



**Figure 3.** Distribution of B-cells subsets in peripheral blood from LTRC-MM patients ( $n=13$ ) and age-matched healthy adults ( $n=15$ ). The proportion of (a) total B-cells from lymphocytes, (b) naïve B-cells ( $CD27^+IgM^+IgD^+$ ) from total B-cells, (c) marginal zone-like B-cells ( $CD27^+IgM^+IgD^+$ ) from total B-cells and (d) class-switched memory B-cells ( $CD27^+IgM^+IgD^+$ ) from total B-cells are shown. 'P' value refers to the Kruskal-Wallis test results and the '\*' to the *a posteriori* test (only statistical differences are marked with \* if  $P < 0.05$  or with \*\* if  $P < 0.01$ ). Scales vary depending on the subpopulation analysed.

IMWG criteria.<sup>31,32</sup> Induction treatment was performed with vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) and alternate VBCMP/VBAD (vincristine-carmustine-melphalan-cyclophosphamide-prednisone/vincristine-carmustine-doxorubicin-dexamethasone) chemotherapy. As conditioning therapy for ASCT, high-dose melphalan was used in seven patients and busulphan plus

melphalan in six patients. Two patients received a new drug: low-dose thalidomide as maintenance during 2 years post-ASCT. Apart from these two cases and a short period of monthly low-dose dexamethasone in other four patients during less than 2 years, no other maintenance treatment was administered to this population.



**Table 4.** Concentration of serum Ig and heavy/light chains and values of heavy/light chain ratios of LTCR-MM patients

N°	MM type	IgG (800–1600 mg/dL)	IgA (100–300 mg/dL)	IgM (80–250 mg/dL)	IgGκ (434–1218 mg/dL)	IgGλ (237–591 mg/dL)	IgAκ (43–236 mg/dL)	IgAλ (40–173 mg/dL)	IgGκ/IgGλ ratio (1.26–3.2)	IgAκ/IgAλ ratio (0.58–2.52)
1	BJ κ	783	64,3	52,1						
2	BJ λ	1080	185	58,7						
3	IgG κ	1760	281	240	880,6	797,1			1,10	
4	IgG κ	1090	404	173	392,5	317,5			1,24	
5	IgG κ	734	337	91,4	269	239,5			1,12	
6	IgG κ	980	158	64,6	396,8	236,3			1,68	
7	IgG κ	575	270	96,5	196,5	154,2			1,27	
8	IgG κ	1820	245	129	707,5	654,3			1,08	
9	IgG κ	1370	426	84,1	582,3	431,3			1,35	
10	IgG κ	1490	400	82	NA	NA			NA	
11	BJ λ	1230	223	80,1						
12	IgA λ	940	222	112			103,7	78,5		1,32
13	IgG κ	1650	270	203	511,3	356,7			1,43	

LTCR-MM patients have decreased proportion of naïve T-cells, and a corresponding increased percentage of effector T-cells in the peripheral blood

The distribution of T-cell subsets in the PB of LTCR-MM patients and HBD was compared. The patients had a lower percentage of total CD4<sup>+</sup> T-cells ( $P=0.0004$ ) together with a decrease in the naïve CD4<sup>+</sup> T-cells (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) population ( $P=0.0004$ ) and an increment of the effector memory CD4<sup>+</sup> T-cells (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) ( $P=0.0028$ ), which include both CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> and CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> cells (Figures 1a–c).

Similar results were found within the CD8<sup>+</sup> T-cells. Although no differences were observed in the proportion of total CD8<sup>+</sup> T-cells ( $P=0.1236$ ; Figure 1d), an increment in the percentage of effector memory CD8<sup>+</sup> T-cells ( $P=0.0084$ ; Figure 1f), both CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> and CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>. Conversely, naïve CD8<sup>+</sup> T-cells (CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) were clearly decreased in patients ( $P=0.0007$ ; Figure 1e).

When the analysis was repeated in the same LTCR-MM patients 1 year after the first analysis, no changes were detected neither when analysed as a group (see columns ‘patients+1 year’ in Figure 1) nor when analysed individually (data not shown).

No differences were observed in the Tregs defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>+</sup> (data not shown).

LTCR-MM patients have increased percentage of NK-cells expressing KIR2DL1<sup>+</sup> but a decrease of those expressing Nkp46<sup>+</sup> and a decreased number of CD8<sup>+</sup> T-cells expressing NKG2D<sup>+</sup>

The proportion of total NK-cells was similar in patients and HBD (Figure 2a). However, patients showed higher expression of the inhibitory receptor KIR2DL1<sup>+</sup> ( $P=0.0326$ ), a higher expression of NKG2A<sup>+</sup> in the NK-cell population ( $P=0.0206$ ) and lower expression of the activating receptor Nkp46<sup>+</sup> ( $P=0.0146$ ) (Figures 2b–d). A reduction in the expression of NKG2D<sup>+</sup> in the CD8<sup>+</sup> T-cell population was also observed in patients ( $P=0.0019$ ) (Figure 2e). Similar to T-cells, this NK-cell profile was maintained after 1 year in the same patients when analysed individually (data not shown).

Distribution of the B-cell subpopulations in the peripheral blood of LTCR-MM patients and healthy blood donors

The mean of the percentage of total B-cells (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>) in the patients was within the normal range and no significant differences were found when compared to HBD (Figure 3a). Even though the range of percentage values in patients was quite wide, the specific percentage of B-cells was maintained in the same patient 1 year after (data not shown). However, naïve B-cells (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) proportion was higher in patients (Figure 3b;  $P=0.0308$ ), and a corresponding reduction of marginal zone-like B-cells (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>,  $P=0.0047$ ) and class-switched memory B-cells (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>,  $P=0.0043$ ) was observed (Figures 3c and d). The immune signature of the B-cells was unchanged when patients

were evaluated one year later either as a whole (see columns ‘patients+1 year’ in Figure 3) or individually (data not shown).

No differences were observed in the percentage of transitional B-cells (CD27<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) or plasmablasts (CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) in the PB of the two groups (data not shown).

#### HLC ratios values of LTCR-MM patients

To accurately evaluate the CR status and the immune reconstitution in our patients, we quantified all the Igs as well as the individual isotypes of the patient’s affected Ig (Table 4). With the only exception of patient 1 who showed a moderate hypogammaglobulinemia, no immunosuppression and/or altered HLC ratios were observed in LTCR-MM patients, agreeing with the CR stage of the patients and the complete reconstitution of their humoral immunity (Table 4).

#### DISCUSSION

Recent studies have reported a survival rate of 15% approximately after 10–15 years of the HDT/ASCT<sup>5,6</sup> when the relapse rate is very low. These patients could have achieved an ‘operational cure’ associated to a particular immune reconstitution profile, which has not been defined yet.<sup>12</sup> Therefore, we aimed to analyse the distribution of T-, NK- and B-cell subpopulations and the immunoparesis in LTCR-MM patients after ASCT. An important increment of the percentage of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector memory T-cells was found in parallel to an increase of naïve B-cells proportions and a redistribution of activating and inhibitory NK-cell receptors. Furthermore, this immune profile was confirmed 1 year later in the same LTCR-MM patients, suggesting a specific immune signature after the ASCT that remains stable while being in CR.

In particular, we evidence an increment of naïve B-cells and a reduction of marginal and class-switched B-cells, which would restore the repertoire of the humoral immune response and the recovery of normal plasma cells. The absence of immunoparesis in these patients is in accordance to this recovery. These findings on B-cells are similar to those obtained by Pessoa de Magalhães *et al.*, although the differences between their LTCR-MM and controls did not reach statistical significance, in probable relationship to different immunophenotypic approaches to identify the B-cell subsets.<sup>33</sup>

In LTCR-MM patients, we also find a reduction of total CD4<sup>+</sup> T-cells and a decrease of naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells compared to HBD. On the contrary, there is an increase of the effector CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell populations and normal proportions of Tregs, suggesting an efficient mechanism to control tumor growth, achieve a CR and maintain an efficacious immune surveillance. Altogether, these results reinforce the idea of the relevant role of T-cells, including conventional T-cells, Tregs and exhausted T-cells, in myelomagenesis and in the clinical outcome

of MM patients, as has been thoroughly reviewed by Dosani *et al.*<sup>21</sup> The knowledge of the role of the immune system in the achievement of a long-term remission is of significance, not only for the development of immunotherapies, but also for the identification of predictive immune biomarkers. In fact, the T-cell exhaustion/senescence ratio has been recently proposed as an interesting immune biomarker, since relapsing patients have higher numbers of exhausted T-cells at +3 months after the transplant but before detection of clinical disease, thus identifying MM patients who could benefit from an early immunotherapy after the ASCT.<sup>34,35</sup>

The NK-cell population, functionally controlled by the balance of activating and inhibitory signals,<sup>36</sup> also plays an important role in controlling the progression of MM.<sup>37</sup> Different activating receptors such as the natural cytotoxic receptor NKp46, DNAM-1 and NKG2D have all been implicated in tumor recognition and killing, including MM.<sup>38,39</sup> In our study, we observed a decreased number of activating receptors like NKp46 together with a trend of increased expression of the inhibitory molecules NKG2A and KIR2DL1 in LTRC-MM patients compared to controls. Therefore, some inhibitory signals seem to dominate in the NK-cells of LTRC-MM patients. It is possible that, in early stages after ASCT or even before, a continuous cytotoxic activity against myeloma cells is exerted by the activating signals of the NK-cells to achieve a CR, which would lead to a downregulation of these activating signals and to an increased expression of inhibitory receptors (NKG2A and KIR2DL1), conforming the characteristic phenotype of terminally differentiated NK-cells.<sup>40</sup>

NKG2D has been described as a costimulatory receptor for human naïve CD8<sup>+</sup> T-cells.<sup>41</sup> This specific population (CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> T-cells) not only plays a critical role in identifying and killing autologous myeloma cells but also seems to improve the survival rate after transplantation.<sup>42</sup> Interestingly, we find a reduction of NKG2D<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> T-cells from LTRC-MM patients compared to controls, which could reflect the expansion of terminally differentiated CD8<sup>+</sup> T-cells that might have down-regulated this receptor.

The HLC assay is a promising tool since it can evaluate the immune reconstitution due to its capacity of measuring the suppression of the uninvolved HLC-pair (for example, measurement of IgAk in a patient with IgAl).<sup>26,28</sup> None of our LTRC-MM patients had altered HLC ratio and therefore, they had no HLC-pair suppression, in accordance with the recovery of a normal humoral immunity.<sup>43</sup>

Immune dysfunction is related to the development and progression of MM.<sup>20,21</sup> In particular, lymphoid cells are significantly altered in myelomagenesis, and their dysfunction closely mirrors the course of the disease.<sup>21</sup> They are therefore appealing candidates for immunotherapy approaches aimed at exploiting, increasing or restoring the myeloma immunosurveillance and disease control. In particular, both T- and NK-cells are already known to have integral roles in the mechanisms of action of currently explored immunotherapies, particularly those of immunomodulatory drugs and mAbs—including elotuzumab, daratumumab and immune checkpoints modulators.<sup>44</sup> It is not in vain that the most efficacious drugs in the maintenance therapy after ASCT are lenalidomide and bortezomib, which rely on the functional activity of the different cytotoxic lymphocytes (cytotoxic T-cells, NK-cells and NKT cells) and the inhibition of Tregs to exert some of their anti-MM effects. Moreover, both lenalidomide and bortezomib have demonstrated to enhance the anti-MM activity of elotuzumab and daratumumab.<sup>45,46</sup> Our study provides knowledge of the immune profile that might be worth aiming for through modern immunomodulatory maintenance therapies, which consists on an increment of effector T-cells and terminally differentiated NK-cells that probably exert a competent immune surveillance. Conversely, the increase of naïve B-cells may guarantee the humoral response homeostasis,

including the recovery of normal plasma cells that might compete with myelomatous cells for normal bone marrow niches. This replenishment of B-cells may contribute to the absence of immunoparesis, what can be better currently evaluated by the HLC-pair suppression. Possibly, in the near future, the HLC assay could be used not only as a marker of MRD but also as a potential marker of robust immune recovery.

The precise role of these refined immune studies in the monitoring and therapeutic decisions in MM patients, and also in the duration of sCR, should be defined in the future. As a first step in this effort, Paiva *et al.* has recently published that immune profiling in BM might allow the identification of patients with different outcomes in transplant-ineligible MM patients.<sup>47</sup> Of importance, prospective similar studies with the different therapies currently used are required to determine whether the immune recovery pattern of LTRC-MM patients differs from that of patients who achieve sCR and that will eventually relapse. In other words, it is important to determine whether these findings can be used as a prognostic predictive testing and if they are reproducible in the current therapeutic scenario which includes new proteasome inhibitors, IMiDs, mAbs and other immune strategies to evaluate the role of immunomodulatory drugs and maintenance strategies.

## CONFLICT OF INTEREST

AA is a member of Advisory Boards of Janssen-Cilag, Celgene and Amgen. The remaining authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all patients and clinical staff who made this study possible. We are very grateful to Ana Ramírez and Víctor López for their valuable help with flow cytometry, to Lorena Vega for statistics advice and to Lawrence Baron for his help with the writing. The grants include Grant PI12/00494P and PI15/02085 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias to CMC supported this work. CMC was co-financed by FEDER funds. AAL is supported by a research grant from the JL Castaño Foundation since September 2015. BA and MGP were granted for the Spanish Leukemia and Lymphoma Foundation.

## REFERENCES

- Gay F, Larocca A, Wijermans P, Cavallo F, Rossi D, Schaafsma R *et al.* Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients. *Blood* 2011; **117**: 3025–3031.
- Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV, Palumbo A, Mateos MV, Orlowski R *et al.* New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia* 2014; **28**: 525–542.
- Kyle RA, Rajkumar SV. An overview of the progress in the treatment of multiple myeloma. *Expert Rev Hematol* 2014; **7**: 5–7.
- Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy of multiple myeloma. *Blood* 2015; **125**: 3076–3084.
- Tureson I, Velez R, Kristinsson SY, Landgren O. Patterns of improved survival in patients with multiple myeloma in the twenty-first century: a population-based study. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 830–834.
- Ludwig H, Bolejack V, Crowley J, Bladé J, Miguel JS, Kyle RA *et al.* Survival and years of life lost in different age cohorts of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 1599–1605.
- Durie BGM, Hoering A, Abidi MH, Rajkumar SV, Epstein J, Kahanic SP *et al.* Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2016; **389**: 519–527.
- Wang M, Delasalle K, Feng L, Thomas S, Giral S, Qazilbash M *et al.* CR represents an early index of potential long survival in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2010; **45**: 498–504.
- Martinez-Lopez J, Blade J, Mateos M-V, Grande C, Alegre A, García-Laraña J *et al.* Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. *Blood* 2011; **118**: 529–534.

- 10 Paiva B, Gutiérrez NC, Rosiñol L, Vidriales M-B, Montalbán M-Á, Martínez-López J et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multi-parameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 2012; **119**: 687–691.
- 11 Kumar L, Bova RR, Pai R, Harish P, Mookerjee A, Sainath B et al. Autologous stem cell transplantation for multiple myeloma: long-term results. *Natl Med J India* 29: 192–199.
- 12 Rajkumar SV. Treatment of myeloma: cure vs control. *Mayo Clin Proc* 2008; **83**: 1142–1145.
- 13 Kumar SK, Rajkumar SV. The current status of minimal residual disease assessment in myeloma. *Leukemia* 2014; **28**: 239–240.
- 14 Martínez-López J, Lahuerta JJ, Pepin F, González M, Barrio S, Ayala R et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014; **123**: 3073–3079.
- 15 Rawstron AC, Gregory WM, de Tute RM, Davies FE, Bell SE, Drayson MT et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood* 2015; **125**: 1932–1935.
- 16 Sherrod AM, Hari P, Mosse CA, Walker RC, Cornell RF. Minimal residual disease testing after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2015; **51**: 2–12.
- 17 Paiva B, Puig N, García-Sanz R, San Miguel JF. Is This the time to introduce minimal residual disease in multiple myeloma clinical practice? *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 2001–2008.
- 18 Ege H, Gertz MA, Svetomir N, Lacy MQ, Hayman SR, Kumar K et al. Prediction of survival using absolute lymphocyte count for newly diagnosed patients with multiple myeloma: a retrospective study. *Br J Haematol* 2008; **141**: 792–798.
- 19 Jimenez-zepeda VH, Reece DE, Trudel S, Chen C, Franke N, Winter A et al. Absolute lymphocyte count as predictor of overall survival for patients with multiple myeloma treated with single autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma* 2015; **56**: 2668–2673.
- 20 Dasanu CA. Immune alterations in untreated and treated multiple myeloma. *J Oncol Pharm Pract* 2012; **18**: 257–263.
- 21 Dosani T, Carlsten M, Maric I, Landgren O. The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of MM and their uses in immunotherapies. *Blood Cancer J* 2015; **5**: e306.
- 22 Raitakari M, Brown RD, Sze D, Yuen E, Barrow L, Nelson M et al. T-cell expansions in patients with multiple myeloma have a phenotype of cytotoxic T cells. *Br J Haematol* 2000; **110**: 203–209.
- 23 Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, Moro MJ, Martín-Núñez G, Galende J et al. Characterization of bone marrow T cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and plasma cell leukemia demonstrates increased infiltration by cytotoxic/Th1 T cells demonstrating a skewed TCR-Vbeta repertoire. *Cancer* 2006; **106**: 1296–1305.
- 24 Muthu Raja KR, Rihova L, Zahradova L, Klinecova M, Penka M, Hajek R. Increased T regulatory cells are associated with adverse clinical features and predict progression in multiple myeloma. *PLoS ONE* 2012; **7**: e47077.
- 25 Feyler S, von Lilienfeld-Toal M, Jarmin S, Marles L, Rawstron A, Ashcroft AJ et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+)CD4(+)CD8(–)alpha-betaTCR(+) double negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden. *Br J Haematol* 2009; **144**: 686–695.
- 26 Ludwig H, Milosavljevic D, Zoer N, Faint JM, Bradwell AR, Hübl W et al. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2013; **27**: 213–219.
- 27 Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ et al. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia* 2013; **27**: 208–212.
- 28 Kouliris E, Panayiotidis P, Harding SJ, Kafasi N, Maltezas D, Bartzis V et al. Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by Hevlyte assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma. *Exp Hematol Oncol* 2012; **1**: 9.
- 29 Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, Lin P, Jorgensen JL, Orfao A et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom* 2015; **90**: 26–30.
- 30 Pérez-Persona E, Vidriales M-B, Mateo G, García-Sanz R, Mateos M-V, de Coca AG et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multi-parameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007; **110**: 2586–2592.
- 31 Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006; **20**: 1467–1473.
- 32 Ludwig H, Miguel JS, Dimopoulos MA, Palumbo A, García Sanz R, Powles R et al. International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. *Leukemia* 2014; **28**: 981–992.
- 33 Pessoa de Magalhães RJ, Vidriales M-B, Paiva B, Fernández-Giménez C, García-Sanz R, Mateos M-V et al. Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica* 2013; **98**: 79–86.
- 34 Chung DJ, Pronschinske KB, Shyer JA, Sharma S, Leung S, Curran SA et al. T-cell exhaustion in multiple myeloma relapse after autotransplant: optimal timing of immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2016; **4**: 61–71.
- 35 Rosenblatt J, Avigan D. Targeting the PD-1/PD-L1 axis in multiple myeloma: a dream or a reality. *Blood* 2016; **129**: 275–279.
- 36 Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol* 2006; **18**: 151–158.
- 37 Jurisic V, Srdic T, Konjevic G, Markovic O, Colovic M. Clinical stage-depending decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients. *Med Oncol* 2007; **24**: 312–317.
- 38 El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and Nkp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res* 2007; **67**: 8444–8449.
- 39 Meehan KR, Talebian L, Tosteson TD, Hill JM, Szczepiorkowski Z, Sentman CL et al. Adoptive cellular therapy using cells enriched for NKG2D+CD3+CD8+T cells after autologous transplantation for myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013; **19**: 129–137.
- 40 Morice WG. The immunophenotypic attributes of NK cells and NK-cell lineage lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2007; **127**: 881–886.
- 41 Maasho K, Opoku-Anane J, Marusina AI, Coligan JE, Borrego F, Cutting Edge. NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8+ T cells. *J Immunol* 2005; **174**: 4480–4484.
- 42 Talebian L, Fischer DA, Wu J, Channon JY, Sentman CL, Ernstoff MS et al. The natural killer-activating receptor, NKG2D, on CD3+CD8+ T cells plays a critical role in identifying and killing autologous myeloma cells. *Transfusion* 2014; **54**: 1515–1521.
- 43 Tovar N, Fernández de Larrea C, Elena M, Cibeira MT, Aróstegui JI, Rosiñol L et al. Prognostic impact of serum immunoglobulin heavy/light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission after autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl* 2012; **18**: 1076–1079.
- 44 Kocoglu M, Badros A. The role of immunotherapy in multiple myeloma. *Pharmaceuticals* 2016; **9**: 3.
- 45 Lonial S, Vij R, Harousseau J-L, Facon T, Moreau P, Mazumder A et al. Elotuzumab in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 1953–1959.
- 46 van der Veer MS, de Weers M, van Kessel B, Bakker JM, Wittebol S, Parren PWHI et al. Towards effective immunotherapy of myeloma: enhanced elimination of myeloma cells by combination of lenalidomide with the human CD38 monoclonal antibody daratumumab. *Haematologica* 2011; **96**: 284–290.
- 47 Paiva B, Cedena M-T, Puig N, Arana P, Vidriales M-B, Cordon L et al. Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood* 2016; **127**: 3165–3174.

Supplementary Information accompanies this paper on Bone Marrow Transplantation website (<http://www.nature.com/bmt>)

## LETTER TO THE EDITOR

## Involved/uninvolved heavy/light chain index can predict progression in transplanted multiple myeloma patients

*Bone Marrow Transplantation* (2017) **52**, 1206–1207; doi:10.1038/bmt.2017.97; published online 5 June 2017

Multiple myeloma (MM) is a neoplastic plasma-cell disorder characterized by clonal proliferation of malignant plasma cells in the bone marrow microenvironment, the presence of monoclonal protein in the blood or urine and associated organ dysfunction.<sup>1</sup> In recent decades, the widespread use of autologous stem cell transplantation (ASCT) and the introduction into clinical practice of the novel agents, including proteasome inhibitors (bortezomib) and the immunomodulatory derivatives thalidomide and lenalidomide, have significantly contributed to major advances in MM therapy and prognosis.<sup>2,3</sup> Nonetheless, MM remains incurable, and the majority of patients eventually relapse after a variable period of time.

Current criteria for determining progressive disease and relapse are principally based on elevations in monoclonal protein (M-protein) or free light chains (FLC).<sup>4</sup> Bone marrow plasma cell percentage and imaging techniques, such as positron emission tomography (PET) and magnetic resonance imaging are used to confirm progression, particularly in the case of MM patients without measurable M-protein.

There is a need to identify biomarkers that accurately predict relapse or progression to initiate salvage therapy that prevents serious complications such as end-organ damage.

Different parameters, such as circulating and bone marrow plasma cells or the combination of fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography (FDG-PET/CT) with laboratory data are suggested to predict earlier relapse in MM but they have not been validated yet.<sup>5–7</sup>

The aim of our study was to identify laboratory variables that could predict early MM relapse/progression in a cohort of transplanted MM patients.

We prospectively followed 44 MM-transplanted patients: 19 with IgG-kappa isotype, 11 with IgG-lambda, 9 with IgA-kappa and 5 with IgA-lambda. They were followed for  $29.0 \pm 3.8$  months (mean  $\pm$  s.e.). Serial serum samples from each of the MM patients were collected periodically after ASCT.

We considered as relapsing patients those who underwent relapse or disease progression according to International Myeloma Working Group (IMWG) consensus statement.<sup>4</sup>

Involved/uninvolved index (I/U<sub>i</sub>) was calculated using the monoclonal chain (Involved) as numerator and the polyclonal chain of the same class (Uninvolved) as denominator.

The heavy/light chain (HLC) ratio (rHLC) was calculated as IgGκ/IgGλ or IgAκ/IgAλ with normal reference ranges established as 1.3–3.7 for IgG and 0.7–2.2 for IgA.<sup>8</sup>

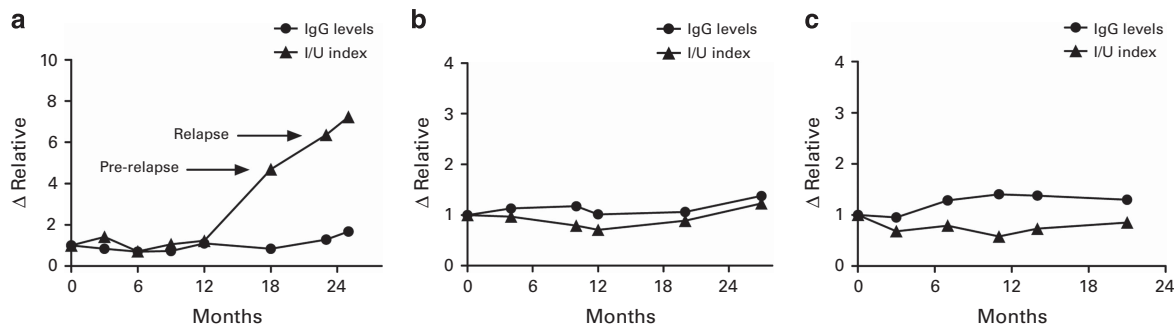
To identify factors that predict disease progression in MM-transplanted patients, we studied HLC pair quantification, FLC and total Ig levels in serial serum samples collected along follow-up. Table 1 shows the results of these variables measured in basal

**Table 1.** Results of the different variables in MM-transplanted patients during follow-up

<i>IgG MM (n)</i>			
<i>Relapsing patients (11)</i>			
	<i>Basal samples</i>	<i>Pre-relapse samples</i>	<i>P</i>
Total IgG (mg/dL, mean $\pm$ s.e.)	996.3 $\pm$ 115.4	1213.0 $\pm$ 122.5	0.26
I/U index (mean $\pm$ s.e.)	2.23 $\pm$ 0.67	8.49 $\pm$ 4.01	0.01
HLC ratio (abnormal/normal) (%)	7/4 (64/36)	10/1 (91/9)	0.31
FLC ratio (abnormal/normal) (%)	5/6 (45/65)	7/4 (64/36)	0.66
<i>Complete remission patients (14)</i>			
	<i>Basal samples</i>	<i>Final samples</i>	
Total IgG (mg/dL, mean $\pm$ s.e.)	1017.0 $\pm$ 115.4	1099.0 $\pm$ 91.71	0.64
I/U index (mean $\pm$ s.e.)	1.37 $\pm$ 0.18	1.35 $\pm$ 0.19	0.98
HLC ratio (abnormal/normal) (%)	9/5 (64/36)	5/9 (36/64)	0.25
FLC ratio (abnormal/normal) (%)	3/11 (21/79)	2/12 (14/86)	1.00
<i>Partial response patients (5)</i>			
	<i>Basal samples</i>	<i>Final samples</i>	
Total IgG (g/L, mean $\pm$ s.e.)	1260.0 $\pm$ 103.5	1530.0 $\pm$ 155.9	0.22
I/U index (mean $\pm$ s.e.)	4.43 $\pm$ 0.55	4.55 $\pm$ 0.35	0.84
HLC ratio (abnormal/normal)(%)	2/3 (40/60)	2/3 (40/60)	1.00
FLC ratio (abnormal/normal)(%)	2/3 (40/60)	4/1 (80/20)	0.52
<i>IgA MM (n)</i>			
<i>Relapsing patients (7)</i>			
	<i>Basal samples</i>	<i>Pre-relapse samples</i>	<i>P</i>
Total IgA (mg/dL, mean $\pm$ s.e.)	267.8 $\pm$ 75.9	474.1 $\pm$ 94.2	0.16
I/U index (mean $\pm$ s.e.)	17.7 $\pm$ 8.7	123.0 $\pm$ 97.6	0.45
HLC ratio (abnormal/normal) (%)	4/3	6/1	0.54
FLC ratio (abnormal/normal) (%)	3/4	6/1	0.24
<i>Complete remission patients (7)</i>			
	<i>Basal samples</i>	<i>Final samples</i>	
Total IgA (mg/dL, mean $\pm$ s.e.)	76.9 $\pm$ 11.9	150.9 $\pm$ 32.5	0.13
I/U index (mean $\pm$ s.e.)	1.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	0.90
HLC ratio (abnormal/normal) (%)	0/7 (0/100)	0/7 (0/100)	1
FLC ratio (abnormal/normal) (%)	1/6 (14/86)	1/6 (14/86)	1

Abbreviations: FLC = free light chains; HLC = heavy/light chain; I/U = involved/uninvolved; MM = multiple myeloma.





**Figure 1.** Representative example of the variations of total IgG and I/U<sub>i</sub> along follow-up in MM transplanted patients.

samples (first samples obtained post ASCT) and in samples obtained at the end of follow-up or prior to relapse/progression in case of relapsing patients.

We first examined MM patients with IgG isotype. At the end of follow-up period, 11 of the 30 patients who underwent ASCT progressed, 5 showed a partial remission (PR) and 14 had an immunofixation-negative complete remission (CR).

The I/U<sub>i</sub> was the most accurate factor to predict progression in MM-transplanted patients. In relapsing patients, this index was significantly higher in pre-relapse samples than in basal samples ( $2.23 \pm 0.67$  vs  $8.49 \pm 4.01$ ,  $P = 0.012$ ) and anticipated progression  $4.58 \pm 0.65$  months in advance. Although the I/U<sub>i</sub> remained unchanged in both CR and PR patients, we noticed that I/U<sub>i</sub> was higher in the last group ( $P = 0.002$ ), probably due to the presence of an M component.

We next evaluated the value of the remaining variables in predicting IgG MM relapse. No differences were observed in the percentages of abnormal rHLC and rFLC during follow-up in each group of IgG MM-transplanted patients. Total IgG levels also remained stable in patients in CR along follow-up but they increased progressively in relapsing and PR patients. However, differences between basal and pre-relapse values were not significant.

Figure 1 shows representative examples of the differences between I/U<sub>i</sub> and total IgG in the serial samples obtained from a MM patient of each group. I/U<sub>i</sub> showed an early increase and also higher values than those of total IgG in a relapsing patient (Figure 1a). In patients in PR (Figure 1b) and CR (Figure 1c), the relative increase of I/U<sub>i</sub> and IgG levels run in parallel along follow-up.

We next studied IgA MM patients. Out of the transplanted patients 50% relapsed and the other 50% were in CR. We observed that 71.4% of relapsing patients showed an I/U<sub>i</sub> value above 4.0 in pre-relapse samples whereas no patient in CR showed an I/U<sub>i</sub> value higher than 2.0 ( $P = 0.02$ ) during follow-up. No significant differences were observed in rHLC, rFLC and total IgA concentrations along follow-up in any group.

The I/U<sub>i</sub> ratio is a quantitative marker that reflects the increase of the monoclonal (involved) chain and the decrease of the polyclonal (uninvolved) one. This index can identify MGUS patients at high risk of progression to MM,<sup>9</sup> and is an independent prognostic factor in MM.<sup>10</sup> We describe here that I/U<sub>i</sub> increases earlier than total IgG levels in relapsing IgG MM-transplanted patients prior to progression. This index remained stable in patients in CR and in PR although the later ones showed higher values, thus suggesting that the presence of an M component induces a moderate immunosuppression of the uninvolved chain of the monoclonal isotype. With respect to IgA MM-transplanted patients, values of I/U<sub>i</sub> higher than 4.0 also foresaw a progression event.

Our results show that HLC pair measurement detects early increases of M component in transplanted MM patients. Future studies will further demonstrate the role of the I/U<sub>i</sub> ratio as a biomarker to anticipate progression in MM patients subjected to ASCT.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

M Espiño<sup>1</sup>, A Artech-López<sup>2</sup>, S Medina<sup>1</sup>, C Muñoz-Calleja<sup>2</sup>, MJ Blanchard<sup>3</sup>, A Alegre<sup>4</sup>, FJ López-Jiménez<sup>3</sup> and LM Villar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain;

<sup>2</sup>Department of Immunology, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain;

<sup>3</sup>Department of Hematology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain

and  
<sup>4</sup>Department of Hematology, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain

E-mail: mercedes.espiño@salud.madrid.org

## REFERENCES

- Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1046–1060.
- Ludwig H, Avet-Loiseau H, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh J, Cavo M *et al*. European perspective on multiple myeloma treatment strategies: update following recent congresses. *Oncologist* 2012; **17**: 592–606.
- Mohty B, El-Cheikh J, Yakoub-Agha I, Avet-Loiseau H, Moreau P, Mohty M. Treatment strategies in relapsed and refractory multiple myeloma: a focus on drug sequencing and 'retreatment' approaches in the era of novel agents. *Leukemia* 2012; **26**: 73–85.
- Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, Anderson KC, Dimopoulos M, Kyle R *et al*. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 2011; **117**: 4691–4695.
- Wei A, Westerman D, Feleppa F, Trivett M, Juneja S. Bone marrow plasma cell micro-aggregates detected by immunohistochemistry predict earlier relapse in patients with minimal disease after high-dose therapy for myeloma. *Haematologica* 2005; **90**: 1147–1149.
- Peceliunas V, Janilioniene A, Matuzeviciene R, Zvirblis T, Griskevicius L. Circulating plasma cells predict the outcome of relapsed or refractory multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2012; **53**: 641–647.
- Elliott BM, Peti S, Osman K, Scigliano E, Lee D, Isola L *et al*. Combining FDG-PET/CT with laboratory data yields superior results for prediction of relapse in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2011; **86**: 289–298.
- Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ 3rd *et al*. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia* 2013; **27**: 208–212.
- Espiño M, Medina S, Blanchard MJ, Villar LM. Involved/uninvolved immunoglobulin ratio identifies monoclonal gammopathy of undetermined significance patients at high risk of progression to multiple myeloma. *Br J Haematol* 2014; **164**: 752–755.
- Koulieris E, Panayiotidis P, Harding SJ, Kafasi N, Maltezas D, Bartzis V *et al*. Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by Hevlyte™ assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma. *Exp Hematol Oncol* 2012; **1**: 9.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>